

CECÍLIA KOSMANN

CÓDIGO DE BARRAS (DNA
BARCODE) DE DíPTEROS DE
INTERESSE FORENSE

CURITIBA

2009

CECÍLIA KOSMANN

CÓDIGO DE BARRAS (DNA *BARCODE*) DE DÍPTEROS DE INTERESSE FORENSE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Claudio José Barros de Carvalho

Co-Orientador: Dr. Walter Antonio Pereira Boeger

CURITIBA

2009

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Kosmann, Cecília
Código de barras (DNA *barcode*) de dípteros de interesse forense. /
Cecília Kosmann. – Curitiba, 2009.
72f.: il. ; 30cm.

Orientador: Cláudio José Barros de Carvalho
Co-orientador: Walter Antonio Pereira Boeger

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia).

1. Entomologia forense 2. Díptero - Identificação I. Título II. Carvalho,
Cláudio José de Barros III. Boeger, Walter Antonio Pereira IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia).

CDD (20. ed.) 595.7

CECÍLIA KOSMANN

"CÓDIGO DE BARRAS (DNA *BARCODE*) DE DíPTEROS DE INTERESSE
FORENSE"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre em Ciências Biológicas", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Claudio José Barros de Carvalho (Orientador)
(UFPR)



Profa. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen
(UNESP/BOTUCATU)



Prof. Dr. Eduardo Andrade Botelho de Almeida
(UFPR)

Curitiba, 18 de fevereiro de 2009.

“ Who saw him die? I,
said the fly, with my little
eye, I saw him die”.

Anonymous

AGRADECIMENTOS

Seria hipocrisia dizer que esta dissertação é minha. Esta dissertação é o resultado do esforço comum de diversas pessoas e algumas instituições. Desta forma, sou grata:

A Deus, pelos sopros providenciais de energias positivas durante os últimos dois anos.

Aos meus pais, Claudionor e Valéria, por absolutamente tudo. Por acreditarem em mim mais do que eu mesma. Aos meus irmãos, Jônatas e Guilherme, pelas demonstrações de interesse e inúmeros conselhos. Aos meus sobrinhos, Vitor e Isabel, por deixarem a minha vida mais colorida.

Ao meu orientador, Dr. Claudio J.B. de Carvalho, pela oportunidade que me foi oferecida. Por todo ensinamento que me foi passado neste período, pelas inúmeras discussões e principalmente, pela paciência.

Ao meu co-orientador, Dr. Walter A.P. Boeger, por todo apoio, idéias e sugestões. Aos estudantes do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE) pela ajuda na utilização dos aparelhos, protocolos e reagentes.

À Dr. Patrícia J. Thyssen, da Universidade Estadual Paulista, pelas “figurinhas” trocadas, pelo incentivo e por todas as sugestões para o presente trabalho.

A todos os pesquisadores que enviaram exemplares para a realização deste trabalho: Drs. Maurício O. Moura, Patrícia J. Thyssen, Marta Wolff, Janyra Oliveira-Costa e às estudantes Carina Mara de Souza e Brenda Nury da Costa Nuñez.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade. A todos os professores e funcionários do departamento de Zoologia, pela contribuição à minha formação. Em especial à Prof. Mirna Casagrande, por sempre me receber de maneira

tão carinhosa toda vez que eu bati à sua porta em busca de conselhos, fossem eles acadêmicos ou não.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Aos colegas do Laboratório de Diversidade e Biogeografia de Diptera pelo ótimo convívio nos dois últimos anos, pelo crescimento que tivemos juntos, pelas críticas e sugestões ao trabalho: Danilo Pacheco, Alessandre Colavite, Mirian Mendonça, Diana Grisales-Ochoa, Maureen Turcatel, Elaine Soares, Peter Löwenberg Neto, Jaime Rodriguez, Kirsten Lica, Melise Lecheta, Beatriz Silveira, Karine Vairo, Jéssica Gilung, Aninha Cardon. Especialmente à Dra. Elaine D.G. Soares, por toda ajuda com os protocolos de biologia molecular, análise dos resultados, bem como por todas as proveitosas discussões que tivemos.

Àqueles que foram a meus colegas de curso e minha família nos últimos dois anos e que, por incrível que pareça, me farão sentir falta da cinza Curitiba: aos “Laranjas” Danilo “Dããã” Pacheco, Alessandre Colative, Caroline “Kérol” Neubern, Elaine Fantinatti (minha companheira de bio mol...muita fé pra PCR dar certo!!), Gabriel “Knight” de Paula, André Gava, Antônio “Caíto” Bergamaschi, Milehna Guarido, Antônio “Netão do Gás” dos Santos, Fernando Leivas, Luís Anderson “Ceará” Leite, Thiago Demetrius, Vanusa Horas, Marina Moares, Patrícia “Intrusa” Ziliotto. Meu coração fica apertado em deixá-los aqui.

À Meg e ao Muzak, pelo companheirismo e lealdade e por aguentarem meu mau humor quando os experimentos davam errado.

A todos os animais, vertebrados ou não, utilizados em experimentos. Sem a doação involuntária de suas vidas, a ciência não progrediria. A eles, dedico este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vixi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Entomologia Forense.....	1
1.2. DNA Mitocondrial.....	4
1.3. O Código de Barras da Vida.....	5
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Área de Estudo e Procedimento Experimental.....	10
3.2. Identificação do Material.....	10
3.3. Material Testemunho.....	11
3.4. Extração de DNA.....	11
3.5. Amplificação.....	12
3.6. Sequenciamento.....	12
3.7. Alinhamento.....	13
3.8. Análise dos Dados.....	14
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Armazenamento do Material Testemunha e Extração do DNA.....	16
4.2. Amplificação e Sequenciamento.....	16
4.3. Cladogramas.....	17
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
LISTA DE TABELAS.....	41
LISTA DE FIGURAS.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplares sequenciados no presente estudo.....	39
Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento da citocromo c oxidase subunidade I (COI).....	40
Tabela 3. Sequências oriundas do banco de dados do GenBank.....	40
Tabela 4. Distribuição geográfica das espécies utilizadas no presente estudo.....	41
Tabela 5. Frequência média de bases (ACGT) e de conteúdo (A+T) da citocromo c oxidase subunidade I (COI).....	41
Tabela 6. Comprimento das sequências utilizadas,; número de sítios invariáveis em cada seqüência, número de sítios não-informativos e número de sítios informativos para parcimônia.....	41
Tabela 7. Matriz de diferença genética entre a região <i>barcode</i> de todos os exemplares utilizados no presente estudo.....	42
Tabela 8. Matriz de diferença genética entre a região <i>barcode</i> das espécies utilizadas no presente estudo.....	43
Tabela 9. Matriz de diferença genética da região <i>barcode</i> entre <i>Lucilia eximia</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. cluvia</i> e <i>L. coeruleiviridis</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cladograma obtido a partir de análise de parcimônia.....	45
Figura 2. Cladograma obtido a partir de inferência Bayesiana.....	46
Figura 3. Cladograma obtido a partir de máxima verossimilhança.....	47
Figura 4. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>Ophyra albuquerquei</i> e <i>O. aenescens</i>	48
Figura 5. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>L. cuprina</i> , <i>L. sericata</i> , <i>L. thatuna</i> e <i>Sarconesia chlorogaster</i>	48
Figura 6. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>L. cuprina</i> , <i>L. sericata</i> , <i>L. thatuna</i> , <i>L. caesar</i> e <i>L. porphyrina</i>	49
Figura 7. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>L. eximia</i> de Uberlândia (MG) e <i>L. eximia</i> do GenBank.....	49
Figura 8. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>L. eximia</i> de MG, <i>L. mexicana</i> e <i>L. eximia</i> do GenBank.....	50
Figura 9. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>L. eximia</i> de MG, <i>L. eximia</i> do RS, <i>L. mexicana</i> e <i>L. eximia</i> do GenBank.....	50
Figura 10. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>L. eximia</i> do PR e <i>L. eximia</i> do RJ.....	51
Figura 11. Histograma de frequência e porcentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de <i>L. eximia</i> do PR, <i>L. eximia</i> do RJ, <i>L. cluvia</i> e <i>L. coeruleiviridis</i>	51

RESUMO

A Entomologia Forense utiliza os insetos encontrados em cadáveres para responder diversas perguntas junto às investigações criminais. Para isso, a correta identificação dos espécimes é fundamental, mas muito complicada de ser realizada em imaturos. Tendo em vista este impedimento taxonômico o presente trabalho testa a eficiência da proposta do DNA *Barcode* de identificação de seres eucarióticos, baseada na utilização de um fragmento padronizado da citocromo c oxidase subunidade I (COI), para a identificação de dípteros de interesse forense das famílias Calliphoridae e Muscidae, totalizando 12 espécies. A proposta, utilizando um valor de corte de 3% para diferenciação intra e interespecíficas, mostrou-se válida para a identificação de dípteros de interesse forense: foram separadas das demais *Ophyra albuquerquei* e *O. aenescens*, bem como *Sarconesia chlorogaster*, *Lucilia thatuna*, *L. cluvia*, *L. porphyrina* e *L. caesar*. As diferenças entre os gêneros foram maiores que 3% em todos os casos. Mas em alguns casos a monofilia das seqüências de DNA mitocondrial aqui analisadas não foi comprovada. Não foi possível a separação de *L. cuprina* (coletadas em São Paulo e no Hawaii) e *L. sericata*, que se comportaram como pertencentes a uma mesma espécie, bem como *L. coeruleiviridis* e *L. mexicana*, que foram agrupadas com haplótipos diferentes de *L. eximia*. Os exemplares de *L. eximia* de diversas localidades do Brasil foram divididos em três unidades biológicas distintas. A identificação das espécies é mais acurada em grupos bem estudados e revisados.

ABSTRACT

Forensic entomology uses insects collected on corpses in order to answer several questions within criminal investigations. For that, the unambiguous identification is crucial but, sometimes, all most impossible to be performed in maggots. Aiming to find a way to transpose this taxonomic obstacle, this study tested the accuracy of DNA Barcode methodology to identify eukaryotic species, based on a standardized gene fragment from the cytochrome c oxidase subunit I, in order to identify 12 flies species, from the families Caliphoridae and Muscidae. The method, using the maximum value of 3% for conspecific nucleotide diversity, was found to be suitable for the identification of forensic important flies: *Ophyra albuquerquei* and *O. aenescens* were separated from each other and from the others, as well as *Sarconesia chlorogaster*, *Lucilia thatuna*, *L. cluvia*, *L. porphyrina* and *L. caesar*. The interspecific differences were higher than 3% in all cases. But, in some cases, the mitochondrial DNA monophyly were not confirmed. The COI barcode sequence could not correctly separate *L. cuprina* (from São Paulo and Hawaii) from *L. sericata*, which were classified as the same specie. *L. coeruleiviridis* and *L. mexicana* were grouped with different haplotypes of *L. eximia*. The *L. eximia* specimens from several localities from Brazil were grouped in three different biological unities. Species identification is more accurate in well studied and revised groups.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Entomologia Forense

Entomologia forense é a ciência onde os artrópodes e o sistema judicial interagem. Segundo Lord & Stevesson (1986) ela é dividida em três categorias: urbana, de produtos estocados e médico-legal. Esta se baseia na utilização de artrópodes na solução de crimes, frequentemente aqueles ligados à morte violenta (Hall 2001).

O primeiro registro de utilização de insetos para resolução de crimes data do século XIII, na China, mas foi Mégnin (1894) o pioneiro nos estudos sistematizados da entomofauna de cadáveres e o primeiro a listar a sequência cronológica da decomposição de corpos e a colonização dos mesmos por insetos. Ele descreveu oito ondas de invasões sucessivas e previsíveis de artrópodes (especialmente espécies das ordens Diptera, Coleoptera, Lepidoptera e Acarina), os chamados “trabalhadores da morte”.

A análise da sucessão de artrópodes permite a associação de cada espécie ou grupo com um estágio de decomposição, uma vez que cada momento da putrefação cadavérica oferece condições e características que atraem um determinado grupo. Desta forma a sucessão ocorre de acordo com um padrão aparentemente previsível (Oliveira-Costa 2008). A ordem Diptera é muito bem representada nesse padrão de sucessão: Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae caracterizam as duas primeiras ondas de sucessão descritas por (Mégnin 1894). Estes dípteros caliptrados também constituem as fontes mais comuns de evidência coletadas durante a investigação criminal (Wells & Sperling 2001) dos primeiros grupos de organismos atraídos por um corpo após sua morte (Oliveira-Costa 2008).

Duas famílias de Diptera são de especial interesse para o presente estudo: Calliphoridae e Muscidae. A família Calliphoridae é composta por dípteros caliptrados

comumente conhecidos como moscas varejeiras ou de bicheiras, que apresentam distribuição mundial. A grande maioria das espécies e mais da metade dos gêneros estão restritos ao Velho Mundo (Shewel 1987). Na região Neotropical há o registro de 126 espécies, distribuídas em 28 gêneros (Amorim *et al.* 2002). A família é representada no Brasil por 36 espécies endêmicas pertencentes a 14 gêneros (Mello 2003). Segundo Carvalho & Mello-Patiu (2008), existem 17 espécies de califorídeos de interesse forense registradas para o Brasil.

Com relação à Calliphoridae, existe uma grande divergência em relação gênero *Lucilia* Robineau-Desvoidy. Diversos autores, especialmente os da América do Norte (Anderson 2000; Tabor *et al.* 2005), tem tratado algumas das espécies pertencentes a este gênero como pertencentes ao gênero *Phaenicia*. Todavia, trabalhos mais recentes baseados em análises cladísticas (Hall & Wall 1995; Stevens & Wall 1996) elevam novamente *Lucilia* à posição de gênero, uma vez que *Phaenicia* comporta-se como um grupo parafilético, sendo este então interpretado como sinonímia do gênero *Lucilia*. Este será o critério adotado no presente trabalho.

A família Muscidae está presente em todas as regiões biogeográficas e compreende cerca de 4.500 espécies descritas distribuídas em 173 gêneros e oito subfamílias (Carvalho *et al.* 2005). Na região Neotropical são reconhecidos 84 gêneros e 840 espécies (Carvalho & Couri 2002). Espécies de diversos gêneros alimentam-se e desenvolvem-se em carcaças, apresentando grande importância forense. No Brasil, existem 20 espécies de muscídeos de interesse forense (Carvalho & Mello-Patiu 2008).

Tanto os califorídeos quanto os muscídeos ovipõem sobre matéria orgânica em decomposição, utilizando este substrato como fonte protéica para si ou para o desenvolvimento das fases imaturas (Byrd & Castner 2001). A atividade destes insetos - adultos e imaturos - acelera a putrefação e a desintegração da carcaça (Oliveira-Costa 2008). Determinar as espécies encontradas neste tipo de investigação é o

primeiro passo para uma análise entomológico-forense, uma vez que o erro nas investigações pode levar à obstrução da justiça (Gerber 1987).

A correta identificação da espécie, bem como do estágio larval da mesma, possibilita a estimativa do intervalo pós-morte (IPM - intervalo de tempo entre a exposição do cadáver àquele ambiente e a data em que o mesmo foi encontrado) com um ótimo grau de aproximação, especialmente em cadáveres em estado de decomposição mais avançado (Wells & LaMotte 2001).

Os insetos ainda podem responder outras perguntas além do IPM, como modo ou causa da morte (Oliveira-Costa & Lopes 2000; Oliva 2001), deslocamento do cadáver (Goff 1991), associação de suspeitos com a cena do crime (Repogle *et al.* 1994; Introna *et al.* 1998; Lord *et al.* 1998), investigação de uso de substâncias tóxicas pela vítima (Campobasso *et al.* 2004; O'Brien & Turner 2004), bem como maus tratos a seres humanos (Benecke & Lessig 2001, Benecke *et al.* 2004) e a animais (Anderson & Huitson 2004).

O tempo de desenvolvimento, resposta à diapausa, bem como as características ecológicas entre espécies necrófagas podem diferir, ainda que dentro de um mesmo gênero (Higley & Haskell 2001). Um mesmo estágio de desenvolvimento das larvas encontradas no corpo não necessariamente indica a mesma idade ou o mesmo tempo de colonização (Amendt *et al.* 2004). Dessa forma, faz-se também necessário o conhecimento do ciclo de vida e características biológicas e ecológicas dos insetos (Erzinçlioglu 1983).

A maioria dos insetos necrófagos, quando no estágio adulto, pode ser identificada morfológicamente, mas a identificação de estágios imaturos é muito complicada e, às vezes, impossível (Schroeder *et al.* 2003; Wells & Stevens 2008). Caracteres diagnósticos para imaturos de diversas espécies de dípteros de interesse forense são poucos e, às vezes, inexistentes (Wells & Stevens 2008). Além de diferenças morfológicas inconspícuas entre as espécies, outra dificuldade enfrentada

pelos pesquisadores da área é a variação intraespecífica que existe nas espécies de dípteros (Liu & Greenberg 1989). Assim sendo, existe a necessidade da criação das formas imaturas até a emergência dos adultos para uma correta identificação taxonômica. Em casos criminais, a rápida determinação do IPM é crucial para a investigação. Frequentemente, não há tempo hábil para a criação das larvas até o estágio adulto e os exemplares podem morrer antes que a identificação em nível específico ocorra, acarretando a perda de evidências criminais importantes (Litjens *et al.* 2001; Schroeder *et al.* 2003).

1.2. DNA Mitocondrial

Uma das alternativas encontradas para o problema em questão é o uso do DNA visando à identificação/separação de espécies. Para tal, tem se utilizado o DNA mitocondrial (DNAMt). A combinação de diversas características faz com que o DNAMt seja amplamente utilizado em estudos de caracterização de populações, subespécies e espécies, além de estudos de caráter evolutivo e filogenético (Harrison 1989).

Dentre essas características está o fato do DNAMt ser haplóide, o que faz com que haja apenas uma sequência possa ser detectada no organismo (Moritz *et al.* 1987; Wells & Stevens 2008). Este número único e a transmissão geralmente materna, sem recombinação, o tornam menos suscetível à homogeneização gênica interespecífica (Wilson *et al.* 1985). Sua análise é vantajosa também devido ao seu pequeno tamanho e sua simples estruturação, quando comparado ao genoma nuclear: apresenta somente 37 genes e possui 17 kpb, o que corresponde a cerca de 0,0001% do comprimento total do DNA nuclear em mamíferos (Avice 1991).

Sua estrutura circular dupla fita é covalentemente fechada, compacta, frequentemente não apresentando macromutações na maioria dos animais, tornando sua evolução até 10 vezes mais rápida que genes nucleares de cópia única (Brown &

Simpson 1982). Essa elevada taxa de mutação acarreta uma maior chance da geração de marcadores espécie-específicos (Harrison 1989).

Além destes fatores, cada célula possui centenas de milhares de mitocôndrias (Holland & Parsons 1999). Dessa forma, há uma grande abundância de DNAm em tecidos e este pode ser extraído e analisado a partir de amostras pequenas e/ou degradadas (Holland & Parsons 1999; Benecke & Wells 2000; Otranto & Stevens 2002).

Para a entomologia forense, Wells & Sperling (1999) e Saigusa *et al.* (2005) relataram que espécies de califórídeos difíceis de serem separadas taxonomicamente, inclusive no estágio adulto, foram identificadas através do DNAm. O mesmo ocorre com espécies pertencentes à Sarcophagidae (Zehner *et al.* 2004; Saigusa *et al.* 2005). Espécies de outras ordens de insetos já foram caracterizadas através do uso do DNAm, como Coleoptera (Tuda *et al.* 1995; Hidayat *et al.* 1996; Szalanski & Powers 1996); Hymenoptera (Taylor *et al.* 1997) e Lepidoptera (Sperling & Hickey 1995). Para a identificação de insetos em entomologia forense, o sequenciamento da região mitocondrial é, geralmente, feito para a região que codifica para a citocromo c oxidase subunidade I (Litjens *et al.* 2001; Schroeder *et al.* 2003; Zehner *et al.* 2004; Wells *et al.* 2007, Wells & Stevens 2008).

1.3. O Código de Barras da Vida

Tendo em vista a necessidade de um método alternativo à identificação morfológica das espécies foi desenvolvido o “Projeto do Código de Barras da Vida” (*The Barcode of Life Project* – Hebert *et al.* 2003a), uma iniciativa internacional que visa o desenvolvimento de um sistema universal para identificação de todos os seres eucarióticos baseado em uma abordagem molecular padronizada (Miller 2007). Este projeto foi iniciado em 2003 por pesquisadores da Universidade de Guelph, no Canadá

(<http://www.barcoding.si.edu>) e foi promovido a partir de 2004 através do *Consortium for the Barcoding of Life* (CBOL).

O DNA *Barcode* consiste em uma região de 648pb da COI (posições 58-705 no final da porção 5', tendo como referência o genoma mitocondrial de *Mus musculus* Linnaeus, 1758) e tem como premissa que toda espécie deve apresentar um 'código de barras' único e que a variação interespecífica é bem mais elevada que a intraespecífica (esta de até 3%) (Hebert *et al.* 2003a). Sua sequência é bastante curta, quando comparada ao genoma inteiro e pode ser obtida de um modo relativamente rápido e barato. A padronização de técnicas geralmente diminui custos e aumenta a confiabilidade, resultando em maior difusão e uso (Stoeckle *et al.* 2005).

A escolha deste gene como fragmento padronizado deve-se (i) ao fato do mesmo ser flanqueado por sequências conservadas, o que o torna relativamente fácil de ser isolado e analisado; (ii) os iniciadores universais para este gene são bem estabelecidos, permitindo a amplificação do mesmo em quase todos os filos animais (Avice 1991; Simon *et al.* 1994); (iii) possui um sinal filogenético maior que os demais genes mitocondriais (Sahls & Nyblom 2000) e (iv) possui uma maior variação na terceira posição de seus códons, ainda que mudanças nas seqüências de aminoácidos ocorram mais lentamente que nos demais genes do DNAm (Hebert *et al.* 2003b).

Os dois grandes objetivos do projeto do código de barras da vida são (i) possibilitar a identificação de espécimes em nível específico e (ii) facilitar a descoberta de novas espécies. Esta abordagem vem auxiliar a identificação de organismos – sobretudo os crípticos e microscópicos – cujos caracteres morfológicos diagnósticos sejam inexistentes ou de difícil visualização (Hebert *et al.* 2003a). A proposta é de que qualquer pessoa, em qualquer lugar, a qualquer momento, seja apta a identificar rapidamente e com eficiência a espécie de um determinado espécime, independentemente da condição de preservação do mesmo (Stoeckle *et al.* 2005).

O CBOL é uma iniciativa internacional que busca desenvolver o DNA *Barcode* como um padrão global em taxonomia, sendo uma colaboração entre museus de história natural, herbários, coleções biológicas e instituições que realizam inventários da biodiversidade. O Consórcio busca promover a rápida compilação de dados de DNA *Barcode* de alta qualidade em um banco de dados público de sequências de DNA; o desenvolvimento de novos instrumentos e procedimentos que tornem a proposta cada vez mais barata, rápida e com mobilidade de transporte; a participação de taxônomos e centros de pesquisas em taxonomia em todas as regiões e países; bem como o uso do DNA *Barcode* para o benefício da ciência e sociedade.

Para a rápida compilação dos dados de *barcode* foi desenvolvido o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) que é uma plataforma bioinformática que integra e suporta todas as fases desde a coleta do espécime até a validação da sequência do mesmo como dado de *barcode* (Ratnasingham & Hebert 2007). O BOLD, além de 'abrigar' as sequências, garante a qualidade das mesmas e realiza a análise dos dados de *barcode*. A plataforma usa o "Hidden-Markov Model" para alinhar um fragmento de DNA ao banco de dados da COI e seleciona a sequência mais similar para identificação (Ratnasingham & Hebert 2007). Ele ainda é um veículo para colaboração entre grupos de pesquisa do mundo todo, uma vez que é totalmente digitalizado (Ratnasingham & Hebert 2007). Apesar de esta plataforma reunir e manter todos os dados do código da vida, uma cópia de cada sequência depositada no mesmo e diagnose do espécime são enviados para o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ou outros bancos de dados genômicos (DNA *Data Bank of Japan* – DDBJ, *European Molecular Biology Laboratory* – EMBL) assim que os dados estejam prontos para publicação.

Para que os dados do espécime em questão ganhem o status de *barcode*, alguns critérios devem ser observados: nome da espécie; dados do material testemunho (número e instituição de depósito); dados de coleta (nome do coletor, data

e local da coleta com coordenadas geográficas); nome do identificador do espécime; sequência da COI com, no mínimo, 500 pb; iniciadores utilizados na reação de PCR; eletroferogramas (Ratnasingham & Hebert 2007).

Os maiores obstáculos encontrados na completa aplicação do DNA *Barcode* são: grupos com baixa diversidade gênica em suas sequências, resolução de espécies que divergiram recentemente, detecção de híbridos e os pseudogenes nucleares (Numts) (Stoeckle *et al.* 2005).

Para identificar anomalias junto aos dados de *barcode* ou sequências de baixa qualidade, o BOLD se vale de algumas ferramentas. Primeiramente, todas as sequências são traduzidas em aminoácidos e confrontadas com a proteína da COI para confirmação da sua origem. Em seguida, é feita uma busca por *stop* codons (para detecção de possíveis pseudogenes) e por contaminantes (*e.g.* sequências de fungos, bactérias ou humanas). Se quaisquer erros são encontrados, o pesquisador que submeteu a sequência é contatado e a mesma fica “marcada” (Ratnasingham & Hebert 2007).

Tendo em vista o impedimento taxonômico apresentado dentro da entomologia forense e à grande quantidade de imaturos e fragmentos de insetos coletados em cenas criminais, bem como o desenvolvimento de novas técnicas de identificação, o presente trabalho se propõe a testar a eficácia da proposta do projeto “*The Barcode of Life*” para a identificação de dípteros caliptrados de importância forense.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Testar a eficácia da proposta do CBOL para a identificação das espécies de interesse forense.

Objetivos específicos

- 1 Amplificação e sequenciamento da região do DNA mitocondrial proposta pelo CBOL, através da utilização de iniciadores universais, de dípteros de interesse forense.
- 2 Identificação das espécies de dípteros através das sequências obtidas.
- 3 Avaliação da variação na variação dos nucleotídeos de *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819) de algumas localidades do Brasil.
- 4 Indicação de possíveis problemas taxonômicos em Calliphoridae e/ou Muscidae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo e Procedimento Experimental

O experimento para a coleta de parte dos dípteros foi realizado dentro do campus do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (Curitiba/PR), no mês de novembro de 2007. Como substratos foram utilizados dois coelhos domésticos (*Oryctologus cuniculus* Linnaeus 1758) sacrificados através de deslocamento cervical (Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR, Certificado nº 278, Processo 23075.038575/2007-10) e acondicionados no interior de uma armadilha do tipo Shannon modificada (W.H.O. 1982). As coletas foram realizadas diariamente de forma ativa com auxílio de vidros letais confeccionados conforme proposto por Almeida *et al.* (1998).

3.2. Identificação do Material

Logo após cada coleta, os exemplares de dípteros coletados foram triados em famílias, baseando-se em caracteres de asa, tamanho, coloração e quetotaxia. Em seguida, todos os exemplares de cada família foram identificados ao nível específico, acondicionados em microtubos etiquetados contendo etanol 96% e preservados em freezer a -20°C.

Foram recebidos exemplares coletados em outras localidades do Brasil (Tabela 1). Estes foram transportados em etanol 96% e posteriormente preservados sob as mesmas condições anteriormente descritas.

A identificação de Muscidae seguiu Carvalho (2002), enquanto que a de Calliphoridae seguiu Carvalho & Ribeiro (2000), Mello (2003), Whitworth (2006) e Carvalho & Mello-Patiu (2008).

No presente trabalho foram utilizados exemplares de 12 espécies pertencentes a duas famílias de dípteros caliptrados. Junto à família Calliphoridae foram analisados exemplares de *L. eximia*, *L. cuprina* (Wiedemann, 1830), *L. sericata* (Meigen, 1826), *L. mexicana* (Macquart, 1843), *L. cluvia* (Walker, 1849), *L. coeruleiviridis* (Macquart, 1855), *L. thatuna* (Shannon, 1926), *L. porphyrina* (Walker, 1856), *L. ceasar* (Linnaeus, 1758) e *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830). Foram ainda incluídos no estudo os muscídeos *Ophyra albuquerquei* Lopes, 1985 e *O. aenescens* (Wiedemann, 1830).

3.3. Material Testemunho

A cabeça, asas, abdômen e pernas dos exemplares foram acondicionados em microtubos contendo etanol 96%, devidamente etiquetados (Local, data, coletor, identificação e código de acesso ao BOLD) e depositados como testemunha na Coleção de Entomologia Padre Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (DZUP).

3.4. Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir do tórax dos exemplares estocados e preservados em etanol 96%. As amostras foram maceradas em solução de lise SDS/Proteinase K (480 µl de 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0; 20 µl de 20 mg/ml proteinase K) e, em seguida, incubadas por 3 horas em banho-maria a 55°C. A seguir, foram adicionados 500µl de EZDNA KIT (Biosystems®) seguido por nova incubação à temperatura ambiente por 12 horas. As amostras foram então centrifugadas e os sobrenadantes foram lavados três vezes em etanol (95-100%) para a precipitação do DNA, depois secos e ressuspensos em 70µl de TE (10 mM Tris, 50 mM EDTA, H₂O ultrapura). O

DNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro de massa e estocado em freezer a -20°C.

3.5. Amplificação

A região de DNA mitocondrial utilizada foi a porção final da citocromo c oxidase subunidade I (COI), correspondente à região do DNA *Barcode* (Hebert *et al.* 2003a). Este seguimento foi amplificado através do conjunto de iniciadores LCO1490-L e HCO2198-L (Nelson *et al.* 2007) (Tabela 2). A amplificação foi realizada utilizando-se 40 ng de DNA; 25 mM de dNTP; 20 mM de cada iniciador; 2,5 U de Taq e 3-4 mM de MgCl₂.

Os ciclos de temperatura de PCR, realizado em um termociclador (Mastecycler® - Eppendorf), consistiram em um passo de desnaturação inicial de 94°C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 30 segundos, e elongação a 72°C por 2 minutos. O último ciclo foi seguido de uma incubação a 72°C por cinco minutos para completar quaisquer fitas parcialmente sintetizadas (Nelson *et al.* 2007). Em todas as reações realizadas, foram incluídos controles brancos para avaliar a presença e/ou ausência de possíveis contaminantes ou inibidores durante o processo de extração de DNA e/ou preparação das reações de PCR.

3.6. Sequenciamento

Os amplicons foram visualizados em eletroforese com gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo. Em seguida foram purificados seguindo protocolo baseado em polietilenoglicol (PEG) e estocados em freezer a -20°C.

A reação de sequenciamento foi feita com 40 ng de DNA; 1,6 μ M do mesmo iniciador da PCR e kit de sequenciamento ABIPRISM® Big Dye™ Terminator v.3.0. A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastecycler® - Eppendorf) , em que os ciclos consistiram de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, e submetida a 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e alongação a 60°C por 4 minutos (Nelson *et al.* 2007).

A purificação dos produtos de sequenciamento obtidos foi realizada em colunas de sephadex CentriSep Columns Princeton Separation, liofilizada e encaminhada ao Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva da Universidade Federal do Paraná (LEMPE-UFPR), para sequenciamento no sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystem®).

3.7. Alinhamento

A COI foi sequenciada separadamente para cada um dos iniciadores e o *contig* alinhado com o Staden Package (Staden *et al.* 1992-2000). O alinhamento das fitas complementares permite a confirmação das sequências. Todas as sequências de consenso produzidas tiveram seus eletroferogramas analisados visualmente com o auxílio do mesmo pacote, bem como o grau de confiabilidade para cada posição, a fim de ratificar as sequências de nucleotídeos e aumentar a confiabilidade dos resultados.

As sequências de consenso foram alinhadas através do Clustal W (Thompson *et al.* 1994), utilizando os parâmetros *default* e, a seguir, foram conferidas e editadas manualmente, com o auxílio da sequência de aminoácidos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) disponível no GenBank (EU154477 – posições 1372 a 1983).

Todas as sequências de consenso foram submetidas ao BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação do posicionamento taxonômico das mesmas.

3.8. Análise dos Dados

A escolha do modelo de evolução molecular mais adequado foi feita a partir do programa jModelTest (Posada 2008), usando o critério de menor informação teórica (AIC). O modelo escolhido foi utilizado em todas as análises.

Para testar o método de identificação global proposto por Hebert *et al.* (2003a), foram realizadas as seguintes análises filogenéticas: parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana. As árvores de parcimônia e máxima verossimilhança foram geradas através do programa PAUP*4.0b10 (Swofford 2003), e por inferência bayesiana, do programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

Para a análise de parcimônia foram utilizados os comandos hsearch addseq=random nreps=500 rseed=2 hold=20 swap=tbr multrees=yes.

Para a análise de máxima verossimilhança foram utilizados os comandos hs star=stepwise k=no mult=yes ret=no ad=closest nr=10 rse=0 rst=no sa=no ra=addseq h=1 sw=tbr t=none rea=none li=no rec=infinity ste=no nc=0 chucks=0 ab=no stat=yes d=none.

A análise de inferência bayesiana foi realizada com 2.000.000 de gerações e burnin=5.000. Os comandos utilizados foram: hs star=stepwise k=no mult=yes ret=no ad=closest nr=1000 rse=0 rst=no sa=no ra=trees h=1 sw=tbr t=none rea=none li=no rec=infinity ste=no nc=0 chucks=0 ab=no stat=yes d=none.

Os suportes dos ramos foram calculados através do programa PAUP*4.0b10 (Swofford 2003): na análise de parcimônia o suporte escolhido foi o bootstrap (1000 replicações) e na inferência bayesiana, probabilidade posterior.

As inserções e deleções foram tratadas como dados ausentes nas três análises. Como grupo externo foi utilizada a sequência de *M. domestica* disponível no GenBank (EU154477).

A divergência entre as sequências de nucleotídeos foi calculada par a par usando o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007) e, a partir da matriz gerada foram confeccionados histogramas de frequência para melhor visualização da delimitação das espécies.

4. RESULTADOS

4.1. Armazenamento do Material Testemunha e Extração do DNA

O material testemunha de cada indivíduo sequenciado com sucesso está depositado na Coleção de Entomologia Padre Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (DZUP) e as suas respectivas sequências serão depositadas no BOLD (Tabela 1).

A extração do DNA genômico foi executada de forma satisfatória em todos dos indivíduos coletados, sendo que as concentrações de DNA obtidas variaram entre 2,45 e 230 ng/μl.

4.2. Amplificação e Sequenciamento

Em 75% das amostras não foi possível a obtenção de amplicons da COI (falha na amplificação por PCR de 279 amostras num total de 372). Como o CBOL prevê a utilização de iniciadores universais, não foi possível a utilização de um conjunto diferente de iniciadores para transpor este obstáculo e estes espécimes foram descartados. Todos os amplicons de COI foram purificados satisfatoriamente com PEG.

Os picos bem definidos nos eletroferogramas bem como a ausência de códons de parada nas sequências (dados não mostrados) descartam a possibilidade de amplificação de pseudogenes (Zhang & Hewitt 1996).

Foram obtidas 28 sequências com 612 pb e uma – *L. sericata* - com 607 pb (Anexo I), sendo observadas deleções nas posições 7-11. O baixo número de *indels* propiciou um fácil alinhamento das sequências, como esperado para genes

codificantes de proteínas (Hebert *et al.* 2003b). Informações sobre os indivíduos sequenciados nesta etapa do estudo são apresentadas na Tabela 1.

Mesmo após inúmeras repetições de sequenciamento, algumas amostras não produziram sequências de consenso superiores a 650 pb e com boa resolução. Dessa forma, durante o alinhamento das sequências de consenso de todos os indivíduos, foram eliminadas as extremidades não sobrepostas para a uniformidade e sobreposição total das sequências (612 pb).

Tendo em vista o insucesso em alguns sequenciamentos, foram utilizadas sequências de espécies do gênero *Lucilia* publicadas no GenBank (Tabela 3), a fim de aumentar o número de espécies para que a metodologia pudesse ser testada com maior robustez e para que variações congênicas pudessem ser melhor estimadas. A distribuição de todas as espécies utilizadas neste trabalho encontra-se na Tabela 4.

O conteúdo A+T do conjunto das sequências foi de 70,45% (Tabela 5), estando de acordo com aqueles apresentados por genes mitocondriais e confere com as altas taxas apresentadas por insetos para este marcador (Simon *et al.* 1994).

4.3. Cladogramas

O projeto DNA *Barcode* não possui como objetivo a resolução de relações filogenéticas, mas análises filogenéticas devem ser realizadas para a detecção de grupos monofiléticos e consequente delimitação das espécies (Nelson *et al.* 2007).

Para dados do projeto DNA *Barcode of Life* geralmente a análise de dados é feita através de Neighbor-Joining (NJ), uma vez que este exige menos tempo computacional e possui um bom desempenho junto às baixas taxas de divergência (Hebert *et al.* 2003a). Contudo, para o desenvolvimento de metodologias para *barcode*, faz-se necessário a comparação entre diferentes métodos de reconstrução

filogenética (Nelson *et al.* 2007). Em alguns casos, uma análise filogenética simples demais ou inadequada pode não permitir o reconhecimento de grupos monofiléticos, enquanto uma análise com um modelo de evolução mais adequado à COI pode gerar resultados mais consistentes (Nelson *et al.* 2007). O elevado conteúdo A+T pode dificultar a reconstrução filogenética sem a utilização de um modelo de evolução molecular apropriado ao gene em questão (Simon *et al.* 1994).

As análises de máxima verossimilhança e bayesiana foram realizadas com o modelo de evolução molecular TIM1+G, indicado pelo programa jModelTest (Posada 2008).

A análise de parcimônia gerou 332 árvores, sendo observadas substituições nucleotídicas em 161 posições, das quais 130 foram parcimoniosamente informativas (Tabela 6). A árvore mais parcimoniosa apresentou um índice de consistência de 0,58 e de retenção de 0,87 (árvore de consenso na Figura 1). Os valores de bootstrap geralmente foram altos (80 – 100%), principalmente nos ramos terminais, com exceção do clado formado por *L. cuprina* e *L. sericata*.

A árvore bayesiana está representada na Figura 2. Todas as reconstruções apresentaram a mesma topologia, diferindo apenas no posicionamento de *L. thatuna*. Os resultados serão discutidos com base no cladograma gerado por máxima verossimilhança (Figura 3) e o valor de corte para as divergências nucleotídicas utilizado é de 3%, conforme proposto por Hebert *et al.* (2003a).

A média de divergência nucleotídica calculada através do modelo K2P para as espécies do gênero *Lucilia* foi de 5,24% (0 – 10,9) e de 6,3% (0 – 6,6) para as do gênero *Ophyra*, apresentando-se de maneira semelhante àquelas relatadas por Smith *et al.* (2006) para dípteros parasitóides pertencentes à família Tachinidae. Para *Sarconesia chlorogaster*, a média de diferença entre as sequências foi de 0,4% (0 – 0,8%). A diferença dos nucleotídeos entre todos os indivíduos analisados no presente estudo foi de 8,4% (Tabela 7).

Os exemplares de *O. albuquerquei* apresentaram uma variação nucleotídica muito baixa, com uma média de 0,1% (0 – 0,2%) (Tabela 7), o mesmo ocorrendo entre os dois indivíduos pertencentes à *O. aenescens* (0,5%). Contudo, a divergência interespecífica entre as espécies em questão foi de 6,3% (Tabela 8), o que corrobora o método de identificação global proposto por Hebert *et al.* (2003a). O método, então, mostra-se válido para a identificação e diferenciação de dípteros de interesse forense.

O espaço entre as colunas (estas representando as diferenças entre as frequências dos nucleotídeos dos indivíduos) apresentado no histograma de frequência para as espécies de muscídeos (*O. albuquerquei* e *O. aenescens*) (Figura 4), retrata a separação das duas espécies. Os exemplares do gênero *Ophyra* diferenciaram-se dos do gênero *Sarconesia* por 10,7% e dos do gênero *Lucilia* por 11,56%.

Para o clado formado pelos exemplares de *L. cuprina* (do Hawaii e de São Paulo), *L. sericata*, *L. thatuna* e *S. chlorogaster*, a metodologia separa [*L. cuprina* + *L. sericata*], *L. thatuna* e *S. chlorogaster* (Figura 5). Os exemplares de *S. chlorogaster* diferenciaram-se dos do gênero *Lucilia* por 9,96%. *L. thatuna* apresentou uma divergência de 3,9% tanto com *L. cuprina* quanto com *L. sericata* (Tabela 8). As duas sequências de *L. cuprina* do Hawaii apresentaram-se idênticas àsquelas de *L. cuprina* de São Paulo. Os exemplares de *L. cuprina* apresentaram uma divergência de apenas 0,1% entre si (0 – 0,3%) e de cerca de 0,7% (0,5 – 0,8%) para com *L. sericata* (Tabela 8). Desta maneira, as duas espécies não puderam ser separadas através do fragmento da COI utilizado no presente trabalho.

Ao acrescentarmos os exemplares de *L. ceasar* e *L. porphyrina* ao clado anterior (e excluirmos os exemplares do gênero *Sarconesia*, uma vez que estes apresentam uma maior diferença em seus nucleotídeos por pertencerem a outro gênero que os demais), notamos que *L. cuprina* e *L. sericata* continuam comportando-se como pertencentes a uma mesma unidade biológica, enquanto que as demais se

apresentam como unidades independentes (Figura 6). É possível perceber também que, enquanto *L. porphyrina* apresenta uma maior diferença nucleotídica quando comparada às demais sequências, *L. thatuna* e *L. caesar* possuem uma composição gênica mais uniforme junto às espécies do clado em questão (<5%) (Tabela 8).

No clado formado pelos exemplares de *L. eximia* de Minas Gerais e de São Paulo, a metodologia agrupa todos os indivíduos como pertencentes à mesma espécie (Figura 7), com divergência média de 0,7% (Tabela 9). Ao compararmos os indivíduos de *L. eximia* de Minas Gerais com os demais exemplares da espécie, eles não são agrupados na mesma unidade biológica, divergindo em 3,7% entre si (0,002 – 0,109%) (Tabela 7). Ao acrescentamos *L. mexicana* a este clado, as duas espécies não são separadas pela metodologia do DNA *Barcode*, com apenas 1,2% (0,7 – 2,5%) (Tabela 9) de diferença entre seus nucleotídeos (Figura 8).

Ao acrescentarmos ainda o exemplar de *L. eximia* oriundo do Rio Grande do Sul, este não é agrupado juntamente com os exemplares de *L. eximia* de São Paulo e de Minas Gerais, sendo, por esta metodologia, classificado como pertencente à outra espécie (Figura 9). O indivíduo do Rio Grande do Sul apresentou diferença em seus nucleotídeos superior a 3,6% quando comparado a quaisquer outras sequências utilizadas neste estudo (Tabela 7).

Para o clado formado pelas espécies de *L. eximia* do Paraná e do Rio de Janeiro, todos os indivíduos comportam-se como pertencentes à mesma unidade biológica (Figura 10), apresentando uma variação em seus nucleotídeos de 1,5% (1,2 – 2%) (Tabela 9).

Ao acrescentarmos *L. cluvia* e *L. coeruleiviridis* ao clado anterior, *L. cluvia* comporta-se como pertencente à outra espécie que não aquela formada pelos exemplares de *L. eximia* do Paraná e do Rio de Janeiro, com diferença genética de 4,3% e 3,7%, respectivamente (Tabela 9, Figura 11). Já *L. coeruleiviridis* apresentou uma diferença de 2,7 e 2,6% junto aos indivíduos de *L. eximia* do Paraná e do Rio de

Janeiro, respectivamente, sendo considerado como pertencente à mesma unidade biológica destes (Tabela 9). A variação entre *L. cluvia* e *L. coeruleiviridis* foi de 3,4%.

5. DISCUSSÃO

Um sistema de identificação de espécies baseada no DNA deve satisfazer três condições: (i) deve ser possível a extração de DNA de todas as espécies; (ii) a informação contida nas sequências deve ser facilmente analisável e (iii) a informação contida na sequência-alvo deve ser suficiente para permitir a identificação em nível específico (Cywinska *et al.* 2006). Estas três premissas foram alcançadas no presente estudo.

A proposta do código de barras da vida de Hebert *et al.* (2003a) vem sendo reconhecida como uma ferramenta que agrega informação taxonômica, e possui como vantagem o desenvolvimento de “etiquetas taxonômicas” em larga escala.

Sistemas de identificação baseados no DNA dependem da habilidade de distinguir entre as variações intra e interespecíficas. Cywinska *et al.* (2006) relataram que diferenças entre as sequências de COI entre espécies congêneras de mosquitos foi cerca de 20 vezes maior do que dentro da mesma espécie. Os valores entre as diferenças encontrados neste trabalho foram menores que 20 vezes, provavelmente devido à alta variabilidade apresentada pelas espécies do gênero *Lucilia*.

A proposta, utilizando um valor de corte de 3% para variação intra e interespecíficas (Hebert *et al.* 2003a), mostrou-se válida para a identificação de dípteros de interesse forense. As diferenças entre os gêneros foram maiores que 3% em todos os casos. Mas em alguns casos a monofilia dos DNAm (e consequentemente das espécies) aqui analisados não foi comprovada.

Todos os casos em que a divergência intraespecífica foi superior a 3% ocorreram junto ao gênero *Lucilia*. Este gênero há muito carece de uma revisão taxonômica, tendo sido o último trabalho com este intuito na América Latina o publicado por Mello (1961). Os trabalhos atualmente publicados focam-se principalmente na importância

econômica das espécies do gênero *Lucilia*, como causador de miíases primárias e secundárias (Moretti & Thyssen 2006); em trabalhos de entomologia forense (Vanin *et al.* 2008) bem como análises moleculares e cladísticas (Stevens & Wall 1996).

Stevens *et al.* (2002) relataram que exemplares de *L. cuprina* do Hawaii possuem DNAm não monofilético, apresentando o mesmo haplótipo mitocondrial (COI + COII) de *L. sericata* da mesma região. Os autores relatam que as espécies que ocorrem na região são híbridos e a comparação das divergências entre sequências aponta para possíveis eventos de introdução, como a colonização polinésica. Uma das críticas junto à metodologia do DNA *barcode* é que a mesma não separa híbridos, fato este que pode levar a identificação errônea de um indivíduo. No presente trabalho, *L. sericata* foi classificada como pertencente à mesma espécie daquela dos exemplares de *L. cuprina*, tanto de São Paulo como do Hawaii. O fato de ter sido agrupada juntamente com os indivíduos norte-americanos diminui a probabilidade de que os exemplares das duas espécies coletadas no Estado de São Paulo sejam híbridos.

Já para *L. eximia*, a metodologia separa-a em mais de uma espécie, e agrupa outras espécies (*L. coeruleiviridis* e *L. mexicana*) como pertencentes à *L. eximia*. A não-monofilia de *L. eximia* já era esperada, uma vez que C.J.B. de Carvalho (comunicação pessoal) relatou que este nome deve abranger mais de uma espécie. Seus exemplares apresentam variações morfológicas e um grande espectro de coloração de acordo com a variação latitudinal, que vai do Sul dos EUA até a Argentina e Chile (Tabela 4). Dessa forma, muitos exemplares identificados como *L. eximia* talvez não correspondam à mesma espécie. Neste trabalho, os exemplares coletados no Paraná e no Rio de Janeiro foram considerados como pertencentes à mesma unidade biológica, diferente daquela que agrupa os exemplares de Minas Gerais e São Paulo. O exemplar do Rio Grande do Sul pertence, ainda, a uma terceira unidade biológica.

As espécies do gênero *Lucilia* estão entre as mais comumente utilizadas em estudos e casos envolvendo entomologia forense (Vanin *et al.* 2008). Dessa forma, para que não haja erros nos mesmos, o grupo deve ser bem estudado e revisado, para que se comprove, ou não, a monofilia das espécies. As espécies que não apresentam uma taxonomia bem definida não devem ser utilizadas para este fim.

Outros autores já testaram a metodologia de *barcode* para dípteros da família Calliphoridae. Nelson *et al.* (2007) relatam que o DNA *barcode* identifica com sucesso as nove espécies do gênero *Chrysomya* que ocorrem na Austrália. O gênero é proveniente do Velho Mundo e foi introduzido no Novo Mundo em meados da década de 70 e estabeleceu-se em toda América do Sul e Central, chegando ao Sul dos Estados Unidos. Devido à sua grande importância econômica como causadores de miíases (e.g. *Chrysomya bezziana* na Índia), o gênero possui uma taxonomia bem estabelecida, sendo a última revisão realizada por Dear (1985).

Whitworth *et al.* (2007) utilizando a metodologia de *barcode* não conseguiu separar califorídeos do gênero *Protocalliphora*. Os autores atribuem o fracasso da metodologia à não-monofilia de diversas espécies em nível mitocondrial; em um caso, indivíduos de quatro espécies diferentes possuíam o mesmo código de barras. A falha na diferenciação de 60% das espécies do gênero em questão também pode ser atribuída à hibridização mitocondrial com bactérias endossimbiontes do gênero *Wolbachia*. Tendo em vista que bactérias deste gênero podem estar presente em até 75% dos insetos, os autores concluem que a identificação ao nível específico baseado em sequências mitocondriais pode não ser possível para muitos insetos.

Para testar a eficácia da metodologia do DNA *Barcode*, Elias *et al.* (2007) utilizaram uma grande amostragem de lepidópteros do Equador, usando um grupo com taxonomia bem estabelecida como referência. Os autores relatam que apenas 77% das espécies foram identificadas com sucesso através da metodologia empregada, e esse valor foi reduzido a 68% quando foram incluídos nas análises

exemplares de áreas geográficas distintas e pelo menos um congênere. No trabalho, o uso de uma sequência de DNAm adicional melhorou a identificação das espécies, enquanto que a adição de um gene nuclear mostrou-se satisfatória para a resolução de problemas taxonômicos em algumas espécies. Os autores ainda ressaltam a utilidade das sequências de *barcode* quando os caracteres morfológicos são ambíguos ou desconhecidos, mas recomendam a adição de sequências nucleares. Essa possível falha do *Barcode*, juntamente com sua provável solução, já haviam sido ressaltadas por Hebert *et al.* (2003b).

Examinando o padrão de divergência de nucleotídeos intra e interespecífico na COI e COII (citocromo c oxidase subunidade II) de Lepidoptera e Diptera, Roe & Sperling (2007) concluem que os locais de maior variação na COI-COII variam muito entre os táxons. Também afirmam que não há uma região de 600 pb que seja extremamente informativa dentro dos 2,3 kb da COI-COII e que a região *barcode* não é melhor que outras regiões junto à COI.

Uma vez que já existe uma vasta biblioteca de seqüências de *barcode*, não há sentido na recomendação de outra região para substituir o COI como fragmento padronizado, ainda que esta região exista. Roe & Sperling (2007) sugerem que o tamanho do fragmento seja expandido: em artrópodes, a extensão de 300-400 pb na direção 3' iria abranger uma maior variação nucleotídica e refletiria melhor as divergências intra e interespecíficas.

Problemas com DNA *barcode* tornam-se mais relevantes quando são utilizados para identificação de novas espécies, particularmente em grupos onde a taxonomia morfológica ainda não está bem resolvida. Esta afirmação vem de encontro aos resultados mostrados neste trabalho: em grupos bem revisados, como o gênero *Ophyra* (Pamplona & Couri 1989; Schühli *et al.* 2004), o valor de corte de 3% mostrou-se satisfatório para a separação das duas espécies analisadas no presente trabalho. Já em Calliphoridae, grupo que carece de revisões e apresenta indícios de problemas

taxonômicos (principalmente junto à subfamília Calliphorinae, na qual o gênero *Lucilia* está inserido), este valor não foi suficiente para a separação das espécies descritas através da taxonomia morfológica.

A inserção de mais exemplares daqueles oriundos do GenBank pode ajudar na elucidação dos problemas taxonômicos encontrados neste trabalho. Em trabalhos de *barcode* se deve procurar cobrir a maior área geográfica possível, com coleta de exemplares em diversas áreas, para aumentar a confiabilidade dos resultados.

Uma das justificativas do projeto *Barcode of Life* é que, em 250 anos de existência, a taxonomia tradicional descreveu menos de 15% da diversidade animal do planeta. Os zoólogos justificam-se dizendo que o progresso pode ser lento porque a sistemática é uma ciência complexa, não sendo baseada somente em 650 pb. Eles também acusam a metodologia do *barcode* de ser reducionista uma vez que, apesar de existirem inúmeros conceitos de espécie, o 'conceito' de espécie para o DNA *Barcode* é uma diferença genética de 3%. Desta forma, uma espécie é caracterizada por um grupo de organismos que possui uma diferença entre os seus nucleotídeos em um fragmento de 650 pb maior que 3% para com quaisquer outros grupos (Solé-Cava & Wörheide 2007). Somente através da amostragem de diversos caracteres (morfológicos, ecológicos e moleculares) é que torna-se possível compreender os limites entre as linhagens evolutivas e, com base nestes limites, tomar decisões sobre a delimitação de espécies.

Apesar das críticas ao método, o DNA *Barcode* pode ser muito útil, mas somente depois que o trabalho taxonômico tenha sido feito de maneira adequada (Solé-Cava & Wörheide 2007). E a definição de espécie não deve ser feita somente com base em uma parcela tão ínfima do genoma total. Para esta metodologia baseada no DNA, a inclusão de outros genes de naturezas diferentes é crucial para o estabelecimento da mesma. Mas, enquanto não houver a definição de qual outro fragmento possa ser

usado juntamente com a COI, deve ser feito um esforço visando o aumento do banco de dados já existente.

6. CONCLUSÃO

O sistema de identificação global proposto por Hebert *et al.* (2003a) baseado num fragmento padronizado da COI mostrou-se de fácil amplificação e sequenciamento com a utilização dos iniciadores universais, o que vem facilitar a rápida geração de dados de *barcode* e subsequente identificação das espécies. A metodologia empregada foi eficiente na identificação da maioria das espécies de dípteros utilizadas no presente trabalho: foram separadas das demais *Ophyra albuquerquei* e *O. aenescens*, bem como *Sarconesia chlorogaster*, *Lucilia thatuna*, *L. cluvia*, *L. porphyria* e *L. caesar*. A separação das espécies é mais acurada em grupos bem estudados e revisados.

Não foi possível a separação de *L. cuprina* (coletadas em São Paulo e no Hawaii) e *L. sericata*, que se comportaram como pertencentes a uma mesma espécie, bem como *L. coeruleiviridis* e *L. mexicana*, que foram agrupadas com haplótipos diferentes de *L. eximia*. Os exemplares de *L. eximia* oriundos do PR e RJ foram classificados como pertencentes à mesma espécie, o mesmo ocorrendo com os exemplares coletados em Minas Gerais e São Paulo. O exemplar de *L. eximia* do RS não se comportou como os demais exemplares desta espécie, tendo sido separada dos mesmos. Entre os exemplares de *L. eximia* empregados neste estudo, foram reconhecidas três unidades biológicas, acarretando a comprovação da não-monofilia da espécie. Mais estudos baseados em caracteres morfológicos e moleculares, bem como em dados biogeográficos devem ser realizados visando à resolução da questão taxonômica aqui levantada.

Apesar das discussões calorosas acerca do DNA *Barcode*, suas metodologias e objetivos, a comunidade científica deve aproveitar a oportunidade levantada e

promover a unificação de um sistema taxonômico que possua uma base sólida tanto em taxonomia morfológica quanto em análise de sequências de DNA; e novas fontes de investimentos de iniciativas de *barcode* podem ser usadas para suportar este sistema.

Para o universo da entomologia forense, a utilização da metodologia de *barcode* pode ser de grande valia no auxílio da identificação dos imaturos e fragmentos de insetos coletados junto às investigações criminais. Todavia, seu uso deve limitar-se a grupos bem revisados e com taxonomia bem estabelecida, uma vez que o erro na identificação pode levar à obstrução da justiça.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, L.M.; C.S. de Ribeiro-Costa & L. Marinoni. 1998. **Manual de Coleta, Conservação, Montagem e Identificação de Insetos**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 78p.
- Amendt, J.; R. Zehner & R. Krettek. 2004. Forensic entomology. **Natuwissenschaften** **91**: 51-65.
- Amorim, D.S.; V.C. Silda & M.I.P.A. Balbi. 2002. Estado do conhecimento dos Diptera Neotropicais, p. 29-36. *In*: Costa, C.; S.A. Vanin; J.M. Lobo & A. Melic (eds). **Proyecto de Red Iberoamericano de Biogeografia y Entomologia Sistemática PRIBES 2002**. Zaragoza. m3m-Monografias Tercer Milenio, vol. 2. 329 p.
- Anderson, G.S. 2000. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). **Journal of Forensic Sciences** **45**: 824-832.
- Anderson, G.S. & N.R. Huitson. 2004. Myiasis in pet animals in British Columbia: The potential of forensic entomology for determining duration of possible neglect. **Cat Veterinary Journal** **45**: 993-998.
- Avice, J.C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetics findings on mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics** **25**: 45-69.
- Benecke, M.; E. Joseph & R. Zwihoﬀ. 2004. Neglect of the elderly: forensic entomology cases and considerations. **Forensic Science International** **146**: 195-199.
- Benecke, M. & R. Lessig. 2001. Child neglect and forensic entomology. **Forensic Science International** **120**: 155-159.

- Benecke, M. & J.D. Wells. 2000. DNA Techniques for Forensic Entomology, p. 341 – 352. *In*: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). **Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. Boca Raton. CRC Press LLC. xvii+418p.
- Brown, G.C. & M.V. Simpson. 1982. Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. **Proceedings of the National Academy of Science of USA 79**: 3246-3250.
- Byrd, J.H. & J.L. Castner. 2001. Insects of forensic importance, p. 43 - 80. *In*: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). **Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. Boca Raton. CRC Press LLC. xvii+418p.
- Campobasso, C.P.; M. Gherardi; M. Caligara; L. Sironi & F. Introna. 2004. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **International Journal of Legal Medicine 118**: 110-114.
- Caravas, J.A. & M. Friedrich. No prelo. A Mitochondrial Genome Phylogeny of the Calyptratae.
- Carvalho, C. J. B. de. (ed). 2002. **Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy**. Curitiba, Editora Universidade Federal do Paraná, 287 pp.
- Carvalho, C. J. B. de. & M.S. Couri. 2002. Basal groups, p. 27-132. *In*: Carvalho, C. J. B. de. (ed). **Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy**. Curitiba, Editora Universidade Federal do Paraná, 287 pp.
- Carvalho, C.J.B. de; M.S. Couri; A.C. Pont; D.M. Pamplona & S.M. Lopes. 2005. A Catalogue of the Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region. **Zootaxa 860**: 1-282.
- Carvalho, C.J.B. de & C.A. Mello-Patiu. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia 52**: 390-406.

- Carvalho, C.J.B. de & P.B. Ribeiro. 2000. Chave para a identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 9: 169-173.
- Catalogue of Life. 2008. <http://www.catalogueoflife.org/search.php>. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Cywinska, A.; F.F. Hunter & P.D.N Hebert. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. **Medical and Veterinary Entomology** 20: 413-424.
- Dear, J.P. 1985. A revision of the New World Chrysomyini (Diptera) (Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia** 3: 109-169.
- Elias, M.; R.I. Hill; K.R. Willmott; K.K. Dasmahapatra; A.V.Z. Brower; J. Mallet & C.D. Jiggins. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. **Proceedings of the Royal Society. Series B, Biological Sciences** 274: 2881–2889.
- Erzinçlioglu, Y.Z. 1983. The application of entomology to Forensic Medicine. **Medicine Science and the Law** 23: 228-230.
- Gerber, P. 1987. Playing dice with expert evidence: the lessons to emerge from *Regina v. Chamberlain*. **Medical Journal of Australia** 174: 243-247.
- Goff, M.L. 1991. Comparision of insects species associated with decomposing remains recovered inside of dwellings and outdoors on the island of Oahu. **Journal of Forensic Science** 36: 748-753.
- Hall, D.G. 1965. Family Calliphoridae, pp. 923–933. *In*: Stone, A.; C. W. Sabrosky; W. W. Wirth; R. H. Foote & J. R. Coulson (eds). **A Catalog of the Diptera of America North of Mexico**. Washington D.C., United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Agriculture Handbook 276p.

- Hall, R.D. 2001. Perceptions and status of forensic entomology, p. 1 - 18. *In*: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). **Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. Boca Raton. CRC Press LLC. xvii+418p.
- Hall, M. & R. Wall. 1995. Myiasis of humans and domestic animals. **Advances in Parasitology** **35**: 257-334.
- Harrison, R.G. 1989. Animal mtDNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends Ecology and Evolution** **4**: 6-11.
- Hebert, P.D.N.; A. Cywinska; S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences** **270**: S569-S599.
- Hebert, P.D.N.; S. Ratnasingham & J.R. deWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society. Series B, Biological Sciences** **270**: 313-321.
- Hidayat, F.; T.W. Phillips & H. French-Constant. 1996. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. **Annals of the Entomological Society of America** **89**: 645-652.
- Higley, L.G. & N.H. Haskell. 2001. Insect development and Forensic Entomology, p. 287-302. *In*: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). **Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. Boca Raton. CRC Press LLC. xvii+418p.
- Holland, M.M. & T.J. Parsons. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use for forensic casework. **Forensic Science Review** **11**: 21-50.
- Huckett, H.C. 1965. Family Muscidae, pp. 869–915. *In*: Stone, A.; C. W. Sabrosky; W. W. Wirth; R. H. Foote & J. R. Coulson (eds). **A Catalog of the Diptera of**

- America North of Mexico.** Washington D.C., United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Agriculture Handbook 276p.
- Introna, F.Jr.; C.P. Campobasso & A. Di Fazio. 1998. Three case studies in forensic entomology from southern Italy. **Journal of Forensic Sciences** **43**: 210-214.
- James, M.T. 1970. Family Calliphoridae. *In*: **A Catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States**. São Paulo, Museu de Zoologia da USP. Fascículo 102: 88pp.
- Litjens, P.; A.C. Lessinger & A.M.L. Azeredo-Espin. 2001. Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. **Medical and Veterinary Entomology** **15**: 183-188.
- Liu, D. & B. Greenberg. 1989. Immature stages of some flies of forensic importance. **Annals of the Entomological Society of America** **82**: 80-93.
- Lord, W.D.; J.A. DiZinno; M.R. Wilson ; B. Budowle ; D. Taplin & T.L. Meinking. 1998. Isolation, amplification, and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from a human crab louse, *Pthiruspubis* (L.), blood meals. **Journal of Forensic Science** **43**: 1097-1100.
- Lord, W.D. & J.R. Stevesson. 1986. **Directory of forensic Entomologists**. Def. Pest Mgmt. Info.Anal. Center (eds), Washington: Walter Reed Army Medical Center.
- Mégnin, P. 1894. **La Faune des cadavres**. Paris: Encyclopédie Scientifique dès Aide-Memoire.
- Mello, R.P. 2003. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores** **10**: 255-268.
- Mello, R.P. 1961. Contribuição ao estudo do gênero *Phaenicia* (R.D., 1863) (Diptera, Calliphoridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **59**: 259-278.

- Miller, S.E. 2007. DNA barcoding and the Renaissance of taxonomy. **Proceedings of the Natural Academy of Science of USA** **104**: 4775-4776.
- Moretti, T.C. & P.J. Thyssen. 2006. Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** **58**: 28-30.
- Moritz, C.; T.E. Dowling & W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** **18**: 269-292.
- Nelson, L.A.; J.F. Wallman & M. Downton. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. **Medical and Veterinary Entomology** **21**: 44-52.
- O'Brien, C. & B. Turner. 2004. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **International Journal of Legal Medicine** **118**: 188-189.
- Oliva, A. 2001. Recent advances in Forensic Entomology in Argentina. **Forensic Science International** **120**, Forensic Entomology Special Issue (Ed. M. Benecke): 145-154.
- Oliveira-Costa, J. 2008. A entomologia forense e suas aplicações, p. 39. *In*: Oliveira-Costa, J. (ed). **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios**. Campinas. Millennium Editora. xix + 420p.
- Oliveira-Costa, J. & S.M. Lopes. 2000. A relevância da entomologia forense para a perícia criminal na elucidação de um caso de suicídio. **Entomologia y Vectores** **7**: 203-209.
- Otranto, D. & J.R. Stevens. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal of Parasitology** **32**: 1345-1360.

- Pamplona, D. & M.S. Couri. 1989. Revisão das espécies neotropicais de *Ophyra* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Muscidae, Azelinae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **84**: 419-429.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** **25**: 1253-1256.
- Ratnasingham, S. & P.D.N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes** **7**: 355-364.
- Repogle, J.; W.D. Lord; B. Budowle; T.LMeinking & D. Taplin. 1994. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism analysis: preliminary analysis of human crab louse (Anoplura: Pediculidae) excreta. **Journal of Medical Entomology** **31**: 686-690.
- Roe, A.D. & F.A.H. Sperling. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **44**: 325-345.
- Ronquist, F. & J.P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** **19**: 1572-1574.
- Sahls, G. & K. Nyblom. 2000. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **15**: 235-241.
- Saigusa, K.; M. Takamiya & Y. Aoki. 2005. Species identification of forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. **Legal Medicine** **7**: 175-178.
- Schroeder, H.; H. Klotzbach; S. Elias; C. Augustin & K. Poeschel. 2003. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. **Forensic Science International** **132**: 76-81.

- Schühli, G.S.; C.J.B. de Carvalho & B.M. Wiegmann. 2004. Regarding the taxonomic status of *Ophyra* Robineau-Desvoidy (Muscidae): a molecular approach. **Zootaxa** 712: 1-12.
- Shewell, G.E. 1987. Calliphoridae, p. 1133-1145. *In*: McAlpine, J.F.; B.V. Peterson; G.E. Shewell; H.J. Teskey; J.R. Vockeroth & D.M. Wood (eds.). **Manual of Nearctic Diptera**. Vol. II. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph 28: vi+657p.
- Simon, C.; F. Frati; A. Beckenbach; B. Crespi; H. Liu & P. Flook. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America** 87: 651–701.
- Smith, M. A.; N.E. Wood; D.H. Jansen; W. Hallwachs & P.D.N. Herbert. 2006. From the Cover: DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. **Proceedings of National Academy of Sciences** 103: 3657-3662.
- Solé-Cava, A.M. & G. Wörheide. 2007. The perils and merits (or The Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges a controversial discussion, p. 603-612. *In*: Custódio, M.R.; G. Lôbo-Hajdu; E. Hajdu & G. Muricy (Eds.). **Porifera Research - Biodiversity, Innovation and Sustainability**. Rio de Janeiro: Editora do Museu Nacional do Rio de Janeiro, v. 28.
- Sperling, F.A.H. & D.A. Hickey. 1995. Amplified mitochondrial DNA as a diagnostic marker for species of conifer-feeding *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian Entomologist** 127: 277-288.
- Staden R.; K.F. Beal; J.K. Bonfield. 1992-2002. <http://staden.sourceforge.net/>
- Stevens, J. & R. Wall. 1996. Classification of the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae): a preliminary parsimony analysis. **Journal of Natural History** 30: 1087-1094.

- Stevens, J.R.; R. Wall & J.D. Wells. 2002. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. **Insect Molecular Biology** 11: 141-148.
- Stoeckle, M.; P.E. Waggoner & J.H. Ausubel. 2005. Barcoding Life, Illustrated. Goals, Rationale, Results. ppt v1.3. Disponível em http://phe.rockefeller.edu/PDF_FILES/BLIllustrated26jan04print%20v1-3.pdf, acesso em 01/01/2009.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Szalanski, A.L. & T.O. Powers. 1996. Molecular diagnostics of three *Diabrotica* (Coleoptera: Crysomelidae) pest species. **Journal of Kansas Entomological Society** 69: 260-266.
- Tabor, K.L.; R.D. Fell & C.C. Brewster. 2005. Insect fauna visiting carrion in Southwest Virginia. **Forensic Science International** 150: 73-80.
- Tamura, K.; J. Dudley; M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24: 1596-1599.
- Taylor, D. B.; R.D. Peterson & A.L. Szalanski. 1997. Mitochondrial DNA variation among *Muscidifurax* spp. (Hymenoptera: Pteromalidae), pupal parasitoids of fifth flies (Diptera). **Annals of the Entomological Society of America** 90: 814-824.
- Thompson, J. D.; D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673– 4680.

- Tuda, D.B.; T. Fukatsu & M. Shimada. 1995. Species differentiation of bruchis beetles (Coleoptera: Bruchidae) analyzed by mitochondrial DNA polymorphism. **Applied Entomological Zoology** **30**: 377-380.
- Vanin, S.; P. Tasinato; G. Ducolin; C. Terranova; S. Zancaner; M. Montisci; S.D. Ferrara & M. Turchetto. Use of *Lucilia* species for forensic investigations in Southern Europe. **Forensic Science International** **177**: 37-41.
- Wells, J.D. & L.R. LaMotte. 2001. Estimating the Postmortem Interval, p. 263 - 285. *In*: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). **Forensic Entomology: the utility of arthropods in legal investigations**. Boca Raton. CRC Press LLC. xvii+418p.
- Wells, J.D. & F.A.H. Sperling. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International** **120**: 110-115.
- Wells, J.D. & F.A.H. Sperling. 1999. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). **Annals of the Entomological Society of America** **36**: 222-226.
- Wells, J.D. & J.R. Stevens. 2008. Application of DNA-based methods in forensic entomology. **Annual Review of Entomology** **53**: 103-120.
- Wells, J.D.; R. Wall & J.R. Stevens. 2007. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. **International Journal of Legal Medicine** **121**: 229-233.
- Whitworth, T. 2006. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of America north of México. **Proceedings of the Entomological Society of Washington** **108**: 689-725.
- Whitworth, T.L.; R.D. Dawson; H. Magalon & E. Baudry. 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protophormia* (Diptera:

Calliphoridae). **Proceedings of the Royal Society. Series B, Biological Sciences** **274**: 1731-1739.

W.H.O. 1962. **A practical guide for malaria entomologists in the African Region of W.H.O.** W.H.O., Regional Office of Africa, Brazzaville.

Wilson, A.C.; S.M. Cann; M. George; U.B. Gyllenstein; K.M. Helmbjörnsdóttir; R.G. Higuchi; S.R. Palumbi; L.M. Prager; R.D. Sage & M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society** **26**: 375-400.

Zhang, D.X. & G.M. Hewitt. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends in Ecology and Evolution** **11**: 247–251.

Zehner, R.; J. Amendt; S. Schütt; J. Sauer; R. Krettek & D. Povolny. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). **International Journal of Legal Medicine** **118**: 245-247.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplares sequenciados no presente estudo: número do espécime testemunho, nome da espécie, código do exemplar para as análises, localidade de coleta, número de pares de bases da sequência e data de coleta do exemplar.

Testemunha	Espécie	Código	Localidade	Tamanho	Data de coleta
SC 01	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	<i>S. chlorogaster</i> I	Curitiba/PR	612 pb	09. X. 2007
SC 03	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	<i>S. chlorogaster</i> II	Curitiba/PR	612 pb	09. X. 2007
SC 04	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	<i>S. chlorogaster</i> III	Curitiba/PR	612 pb	09. X. 2007
SC 05	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	<i>S. chlorogaster</i> IV	Curitiba/PR	612 pb	09. X. 2007
SC 06	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	<i>S. chlorogaster</i> V	Curitiba/PR	612 pb	09. X. 2007
OBQ 01	<i>Ophyra albuquerquei</i>	<i>O. albuquerquei</i> I	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
OBQ 02	<i>Ophyra albuquerquei</i>	<i>O. albuquerquei</i> II	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
OBQ 03	<i>Ophyra albuquerquei</i>	<i>O. albuquerquei</i> III	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
OBQ 04	<i>Ophyra albuquerquei</i>	<i>O. albuquerquei</i> IV	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
OBQ 05	<i>Ophyra albuquerquei</i>	<i>O. albuquerquei</i> V	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
OBQ 06	<i>Ophyra albuquerquei</i>	<i>O. albuquerquei</i> VI	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
OAE 05	<i>Ophyra aenescens</i>	<i>O. aenescens</i> I	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
OAE 06	<i>Ophyra aenescens</i>	<i>O. aenescens</i> II	Curitiba/PR	612 pb	19. XI. 2007
LE 04	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> PR I	Curitiba/PR	612 pb	14. XI. 2007
LE06	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> PR II	Curitiba/PR	612 pb	14. XI. 2007
LE 07	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> PR III	Curitiba/PR	612 pb	14. XI. 2007
LE 13	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> RS I	Capão do Leão/RS	612 pb	13. X. 2003
LE 31	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> RJ I	Rio de Janeiro/RJ	612 pb	13. VII. 2007
LE 32	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> RJ II	Rio de Janeiro/RJ	612 pb	13. VII. 2007
LE 35	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> MG I	Uberlândia/MG	612 pb	09. III. 2008
LE 36	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> MG II	Uberlândia/MG	612 pb	09. III. 2008
LE 37	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> MG III	Uberlândia/MG	612 pb	09. III. 2008
LE 38	<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i> MG IV	Uberlândia/MG	612 pb	09. III. 2008
LC 01	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>L. cuprina</i> SP I	Botucatu/SP	612 pb	16. IX. 2008
LC 03	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>L. cuprina</i> SP II	Botucatu/SP	612 pb	16. IX. 2008
LE 04	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>L. cuprina</i> SP III	Botucatu/SP	612 pb	16. IX. 2008
LC 05	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>L. cuprina</i> SP IV	Botucatu/SP	612 pb	16. IX. 2008
LC 06	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>L. cuprina</i> SP VI	Botucatu/SP	612 pb	16. IX. 2008
LS 02	<i>Lucilia sericata</i>	<i>L. sericata</i> SP	Botucatu/SP	607 pb	16. IX. 2008

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento da citocromo c oxidase subunidade I (COI). Codificação dos nucleotídeos segundo IUPAC: (A) adenina; (T) timina; (C) citosina; (G) guanina; (W) A ou T; (R) A ou G.

Iniciador	Posição	Seqüência	Autor
LCO1490-L	1490	GGT CWA CWA ATC ATA AAG ATA TTG G	Nelson <i>et al.</i> 2007
HCO2198-L	2198	TAA ACT TCW GGR TGW CCA AAR AAT CA	Nelson <i>et al.</i> 2007

Tabela 3. Sequências oriundas do banco de dados do GenBank.

Nº de acesso ao GenBank	Espécie	Localidade	Tamanho	Referência
DQ453491	<i>Lucilia eximia</i>	São Paulo/Brasil	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
DQ453490	<i>Lucilia cluvia</i>	New Orleans/EUA	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
DQ453489	<i>Lucilia thatuna</i>	EUA	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
DQ453488	<i>Lucilia ceasar</i>	Inglaterra	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
DQ647330	<i>Lucilia porphyrina</i>	Austrália	612 pb	Nelson <i>et al.</i> 2007
DQ453494	<i>Lucilia coeruleiviridis</i>	Morgantown/EUA	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
DQ453492	<i>Lucilia mexicana</i>	San Francisco/EUA	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
DQ453495	<i>Lucilia cuprina</i>	Oahu/Hawaii/EUA	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
DQ453496	<i>Lucilia cuprina</i>	Oahu/Hawaii/EUA	612 pb	Wells <i>et al.</i> 2007
EU154477	<i>Musca domestica</i>	Desconhecida	612 pb	Caravas & Friedrich (no prelo)

Tabela 4. Distribuição geográfica das espécies utilizadas no presente estudo (Hall 1965; Hocket 1965; James 1970; *Catalogue of Life* 2008).

Espécie	Distribuição
<i>Lucilia eximia</i> (Wiedemann, 1819)	Sul dos EUA (Los Angeles e Texas) até Argentina e Chile; Bahamas; Pequenas e Grandes Antilhas; Américas Central e do Sul; Brasil
<i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1830)	Regiões tropicais e de clima quente; Sul dos EUA até o Uruguai e norte da Argentina
<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1826)	Sul do Canadá até Argentina; Áustria
<i>Lucilia thatuna</i> (Shannon, 1926)	British Columbia até Montana (EUA); Califórnia e Colorado (EUA)
<i>Lucilia cluvia</i> (Walker, 1849)	Sul dos EUA (Mississippi até Carolina do Norte e Flórida), Cuba, Porto Rico, Bahamas; Pequenas e Grandes Antilhas
<i>Lucilia mexicana</i> (Macquart, 1843)	Sul dos Eua; México; Guatemala; Sul do Brasil
<i>Lucilia ceasar</i> (Linnaeus, 1758)	Toda região Paleártica
<i>Lucilia porphyria</i> (Walker, 1856)	Sri Lanka; China; Índia; Malaya; Nepal; Filipinas
<i>Lucilia coeruleiviridis</i> (Macquart, 1855)	EUA
<i>Ophyra albuquerquei</i> Lopes, 1985	Brasil
<i>Ophyra aenescens</i> (Wiedemann, 1830)	EUA; Nicarágua; Bermuda; Bahamas; Pequenas e Grandes Antilhas; Polinésia Francesa; Hawaii; Região Neotropical
<i>Sarconesia chlorogaster</i> (Wiedemann, 1830)	Peru; Brasil; Paraguai; Uruguai; Argentina; Chile; Ilhas de Juan Fernandez; Ilha de Páscoa
<i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758)	Cosmopolita

Tabela 5. Frequência média de bases (ACGT) e de conteúdo (A+T) da citocromo c oxidase subunidade I (COI).

Gene	A	C	G	T	A+T
COI	0,3147	0,1447	0,1508	0,3898	0,7045

Tabela 6. Gene utilizado apresentado: (COMP) comprimento das sequências utilizadas; (INV) número de sítios invariáveis em cada sequência; (NPI) número de sítios não-informativos; (PI) número de sítios informativos para parcimônia.

Gene	COMP	INV	NPI	PI
COI	612	451	31	130

Figura 7. Matriz de diferença genética entre a região *barcode* de todos os exemplares utilizados no presente estudo. As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais.

	<i>L. cuprina</i> SP I	<i>L. cuprina</i> SP II	<i>L. cuprina</i> SP III	<i>L. cuprina</i> SP IV	<i>L. cuprina</i> SP V	<i>L. sericata</i>	<i>L. eximia</i> PR I	<i>L. eximia</i> PR II	<i>L. eximia</i> PR III	<i>L. eximia</i> RS	<i>L. eximia</i> RJ I	<i>L. eximia</i> RJ II	<i>L. eximia</i> MG I	<i>L. eximia</i> MG II	<i>L. eximia</i> MG III	<i>L. eximia</i> MG IV	<i>S. chlorogaster</i> I	<i>S. chlorogaster</i> II	<i>S. chlorogaster</i> III	<i>S. chlorogaster</i> IV	<i>S. chlorogaster</i> V	<i>O. albuquerquei</i> I	<i>O. albuquerquei</i> II	<i>O. albuquerquei</i> III	<i>O. albuquerquei</i> IV	<i>O. albuquerquei</i> V	<i>O. albuquerquei</i> VI	<i>O. aenescens</i> II	<i>O. aenescens</i> I	<i>L. porphyrina</i>	<i>L. cuprina</i> Hawaii I	<i>L. mexicana</i>	<i>L. coeruleiviridis</i>	<i>L. eximia</i> SP	<i>L. cuprina</i> Hawaii II	<i>L. cluvia</i>	<i>L. thatuna</i>	<i>L. caesar</i>	<i>M. domestica</i>
<i>L. cuprina</i> SP I																																							
<i>L. cuprina</i> SP II	0,2																																						
<i>L. cuprina</i> SP III	0,2 0																																						
<i>L. cuprina</i> SP IV	0,2 0 0																																						
<i>L. cuprina</i> SP V	0,2 0 0 0																																						
<i>L. sericata</i>	0,8 0,7 0,1 0,1 0,1																																						
<i>L. eximia</i> PR I	8,0 8,2 8,2 8,2 8,2 8,2																																						
<i>L. eximia</i> PR II	7,8 7,5 7,6 7,6 7,6 7,6 0,7																																						
<i>L. eximia</i> PR III	7,6 7,6 7,5 7,5 7,5 7,5 0,8 0,2																																						
<i>L. eximia</i> RS	7,6 7,6 7,5 7,5 7,5 7,5 5,2 4,7 4,5																																						
<i>L. eximia</i> RJ I	8,4 8,2 8,2 8,2 8,2 8,2 1,8 1,2 1,3 4,8																																						
<i>L. eximia</i> RJ II	8,6 8,4 8,4 8,4 8,4 8,4 2,0 1,3 1,5 5,0 0,2																																						
<i>L. eximia</i> MG I	8,4 8,2 8,2 8,2 8,2 8,2 6,1 5,5 5,5 4,5 6,1 5,9																																						
<i>L. eximia</i> MG II	7,8 7,8 7,8 7,8 7,8 7,8 5,5 5,4 5,2 4,1 5,9 6,1 1,0																																						
<i>L. eximia</i> MG III	7,5 7,6 7,6 7,6 7,6 7,6 5,4 5,2 5,0 4,3 5,7 5,9 1,2 0,7																																						
<i>L. eximia</i> MG IV	7,5 7,8 7,8 7,8 7,8 7,8 5,5 5,7 5,5 4,1 5,9 5,7 1,2 1,0 1,2																																						
<i>S. chlorogaster</i> I	8,0 7,8 7,8 7,8 7,8 7,5 12,4 11,9 11,7 10,9 11,7 11,9 11,0 10,7 10,5 10,7																																						
<i>S. chlorogaster</i> II	8,4 8,2 8,2 8,2 8,2 7,8 12,4 11,9 11,7 11,3 11,7 11,9 11,4 11,1 10,9 11,1 0,3																																						
<i>S. chlorogaster</i> III	8,4 8,2 8,2 8,2 8,2 7,8 12,8 12,3 12,1 11,3 12,1 12,3 11,4 11,0 10,8 11,0 0,3 0,7																																						
<i>S. chlorogaster</i> IV	8,0 7,8 7,8 7,8 7,8 7,5 12,4 11,9 11,7 10,9 11,7 11,9 11,0 10,7 10,5 10,7 0 0,3 0,3																																						
<i>S. chlorogaster</i> V	8,4 8,2 8,2 8,2 8,2 7,8 12,4 11,9 11,7 11,3 11,7 11,9 11,4 11,1 10,9 11,1 0,5 0 0,8 0,5																																						
<i>O. albuquerquei</i> I	9,5 9,7 9,7 9,7 9,7 9,3 12,8 12,6 12,4 13,2 12,8 13,0 13,5 12,9 12,6 12,8 10,2 10,2 10,6 10,2 10,4																																						
<i>O. albuquerquei</i> II	9,3 9,5 9,5 9,5 9,5 9,1 12,6 12,4 12,2 13,0 12,6 12,8 13,3 12,7 12,4 12,6 10,2 10,0 10,4 10,0 10,2 0,2																																						
<i>O. albuquerquei</i> III	9,3 9,5 9,5 9,5 9,5 9,1 12,6 12,4 12,2 13,0 12,6 12,8 13,3 12,7 12,4 12,6 10,0 10,0 10,4 10,0 10,2 0,2 0																																						
<i>O. albuquerquei</i> IV	9,3 9,5 9,5 9,5 9,5 9,1 12,6 12,4 12,2 13,0 12,6 12,8 13,3 12,7 12,4 12,6 10,0 0,10 10,4 10,0 10,2 0,2 0 0																																						
<i>O. albuquerquei</i> V	9,3 9,5 9,5 9,5 9,5 9,1 12,6 12,4 12,2 13,0 12,6 12,8 13,3 12,7 12,4 12,6 10,0 10,0 10,4 10,0 10,2 0,2 0 0 0																																						
<i>O. albuquerquei</i> VI	9,3 9,5 9,5 9,5 9,5 9,1 12,6 12,4 12,2 13,0 12,6 12,8 13,3 12,7 12,4 12,6 10,0 10,0 10,4 10,0 10,2 0,2 0 0 0 0																																						
<i>O. aenescens</i> II	10,8 11,0 11,0 11,0 11,0 10,6 13,3 13,1 12,9 13,3 13,3 13,5 13,7 13,1 12,7 13,1 11,9 12,3 12,3 11,9 12,5 6,4 6,2 6,2 6,2 6,2 6,2																																						
<i>O. aenescens</i> I	10,6 10,8 10,8 10,8 10,8 10,4 13,1 12,9 12,7 13,1 13,1 13,3 13,5 12,9 12,5 12,9 12,1 12,5 12,5 12,1 12,7 6,6 6,4 6,4 6,4 6,4 6,4 0,5																																						
<i>L. porphyrina</i>	7,3 7,1 7,1 7,1 7,1 7,5 8,4 7,8 7,6 9,1 8,6 8,8 10,9 10,5 10,3 10,7 11,6 11,6 12,0 11,6 11,6 12,8 12,6 12,6 12,6 12,6 12,6 13,1 12,9																																						
<i>L. cuprina</i> Hawaii I	0,3 0,2 0,2 0,2 0,2 0,5 8,0 7,5 7,3 7,3 8,0 8,2 8,0 7,6 7,5 7,6 8,0 8,4 8,4 8,0 8,4 9,9 9,7 9,7 9,7 9,7 9,7 10,8 10,6 7,3																																						
<i>L. mexicana</i>	7,5 7,3 7,3 7,3 7,3 7,3 4,6 4,1 3,9 3,6 4,3 4,5 2,5 2,2 2,0 2,2 10,7 11,1 11,1 10,7 11,1 12,4 12,2 12,2 12,2 12,2 12,2 12,9 12,7 9,7 7,1																																						
<i>L. coeruleiviridis</i>	6,4 6,2 6,2 6,2 6,2 5,8 3,2 2,5 2,4 5,0 2,5 2,7 5,7 5,3 5,2 5,3 9,5 9,9 9,9 9,5 9,9 10,6 10,4 10,4 10,4 10,4 10,4 11,2 11,0 8,0 6,0 4,5																																						
<i>L. eximia</i> SP	7,5 7,3 7,3 7,3 7,3 7,3 5,4 4,8 4,7 3,6 5,4 5,6 0,8 0,5 0,7 0,8 10,1 10,5 10,5 10,1 10,5 12,6 12,4 12,4 12,4 12,4 12,4 12,7 12,5 9,9 8,1 1,7 4,8																																						
<i>L. cuprina</i> Hawaii II	0,2 0 0 0 0 0,7 8,2 7,6 7,5 7,5 8,2 8,4 8,2 7,8 7,6 7,8 7,8 8,2 8,2 7,8 8,2 9,7 9,5 9,5 9,5 9,5 9,5 11,0 10,8 7,1 0,2 7,3 6,2 7,3																																						
<i>L. cluvia</i>	8,6 8,4 8,4 8,4 8,4 8,4 4,8 4,1 3,9 5,7 3,6 3,8 6,4 6,1 5,5 6,1 10,9 11,3 11,3 10,9 11,3 13,0 12,8 12,8 12,8 12,8 12,8 13,5 13,3 9,2 8,2 4,8 3,4 5,6 8,4																																						
<i>L. thatuna</i>	3,7 3,9 3,9 3,9 3,9 3,9 7,1 6,9 6,7 7,1 7,1 7,3 8,0 7,5 7,1 7,3 7,1 7,5 7,5 7,1 7,5 10,0 9,9 9,9 9,9 9,9 9,9 11,9 11,7 6,9 3,7 7,1 5,5 7,1 3,9 7,7																																						
<i>L. caesar</i>	5,1 4,9 4,9 4,9 4,9 4,9 8,14 7,8 7,7 7,8 7,7 7,8 8,6 8,2 8,0 8,4 8,4 8,7 8,7 8,4 8,7 11,0 10,8 10,8 10,8 10,8 10,8 11,6 11,4 5,5 5,1 7,5 5,7 7,7 4,9 7,5 4,4																																						
<i>M. domestica</i>	12,3 12,5 13,0 13,0 13,0 12,1 12,7 12,5 12,3 13,3 12,7 12,9 13,9 13,7 13,3 13,5 10,4 10,8 10,8 10,4 10,8 12,7 12,5 12,5 12,5 12,5 12,5 10,4 10,4 13,1 12,3 13,7 10,4 13,3 12,5 12,3 10,8 10,6																																						

Tabela 8. Matriz de diferença genética na região *barcode* entre os pares das espécies incluídas no presente estudo.

	<i>L. cuprina</i>	<i>L. eximia</i>	<i>L. porphyrina</i>	<i>L. cluvia</i>	<i>L. coeruleiviridis</i>	<i>L. sericata</i>	<i>L. thatuna</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. caesar</i>	<i>O. albuquerquei</i>	<i>O. aenescens</i>	<i>S. chlorogaster</i>
<i>L. eximia</i>	7,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. porphyrina</i>	7,2	9,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. cluvia</i>	8,4	5,1	9,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. coeruleiviridis</i>	6,2	4,1	8,0	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sericata</i>	0,7	7,8	7,5	8,4	5,8	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. thatuna</i>	3,8	7,2	6,9	7,7	5,5	3,9	-	-	-	-	-	-
<i>L. mexicana</i>	7,3	3,2	9,7	4,8	4,5	7,3	7,1	-	-	-	-	-
<i>L. caesar</i>	4,8	8,0	5,5	7,5	5,7	4,9	4,4	7,5	-	-	-	-
<i>O. albuquerquei</i>	9,5	12,7	12,6	12,8	10,4	9,1	9,9	12,2	10,8	-	-	-
<i>O. aenescens</i>	10,8	11,9	13,0	13,4	11,1	10,5	11,8	12,8	11,5	6,3	-	-
<i>S. chlorogaster</i>	8,1	11,4	11,7	11,1	9,7	7,7	7,3	10,9	8,6	10,2	12,3	-
<i>M. domestica</i>	12,4	13,1	13,1	12,3	10,4	12,1	10,8	13,7	10,6	12,5	10,4	10,6

Tabela 9. Matriz de diferença genética da região *barcode* entre *L. ex* (*Lucilia eximia*), *L. mex* (*L. mexicana*), *L. cluvia* e *L. coer* (*L. coeruleiviridis*). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais.

	L. ex PR	L. ex RS	L. ex RJ	L. ex MG	L. ex SP	L. mex	L. cluvia
L. ex RS	4,8	-	-	-	-	-	-
L. ex RJ	1,5	4,9	-	-	-	-	-
L. ex MG	5,5	4,3	5,9	-	-	-	-
L. ex SP	5,0	3,6	5,5	0,7	-	-	-
L. mex	4,2	3,6	4,4	1,5	1,7	-	-
L. cluvia	4,3	5,7	3,7	6,0	5,6	4,8	-
L. coer	2,7	5,0	2,6	5,4	4,8	4,5	3,4

LISTA DE FIGURAS

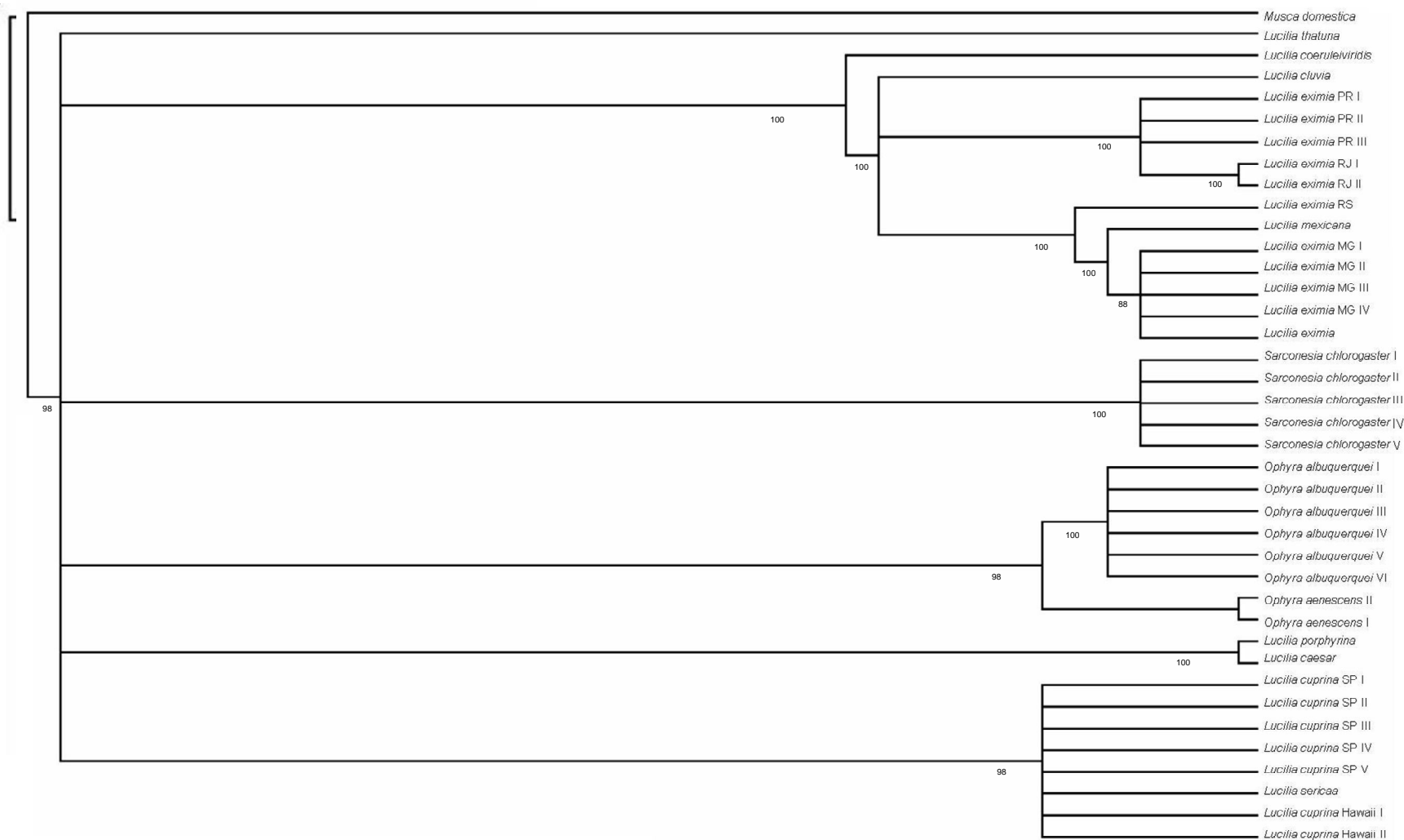


Figura 1. Cladograma obtido a partir de Análise de Parcimônia, consenso de 332; IC = 0,58; IR = 0,87. Os índices correspondem às árvores mais parcimoniosas. Os valores dos ramos correspondem ao bootstrap. As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

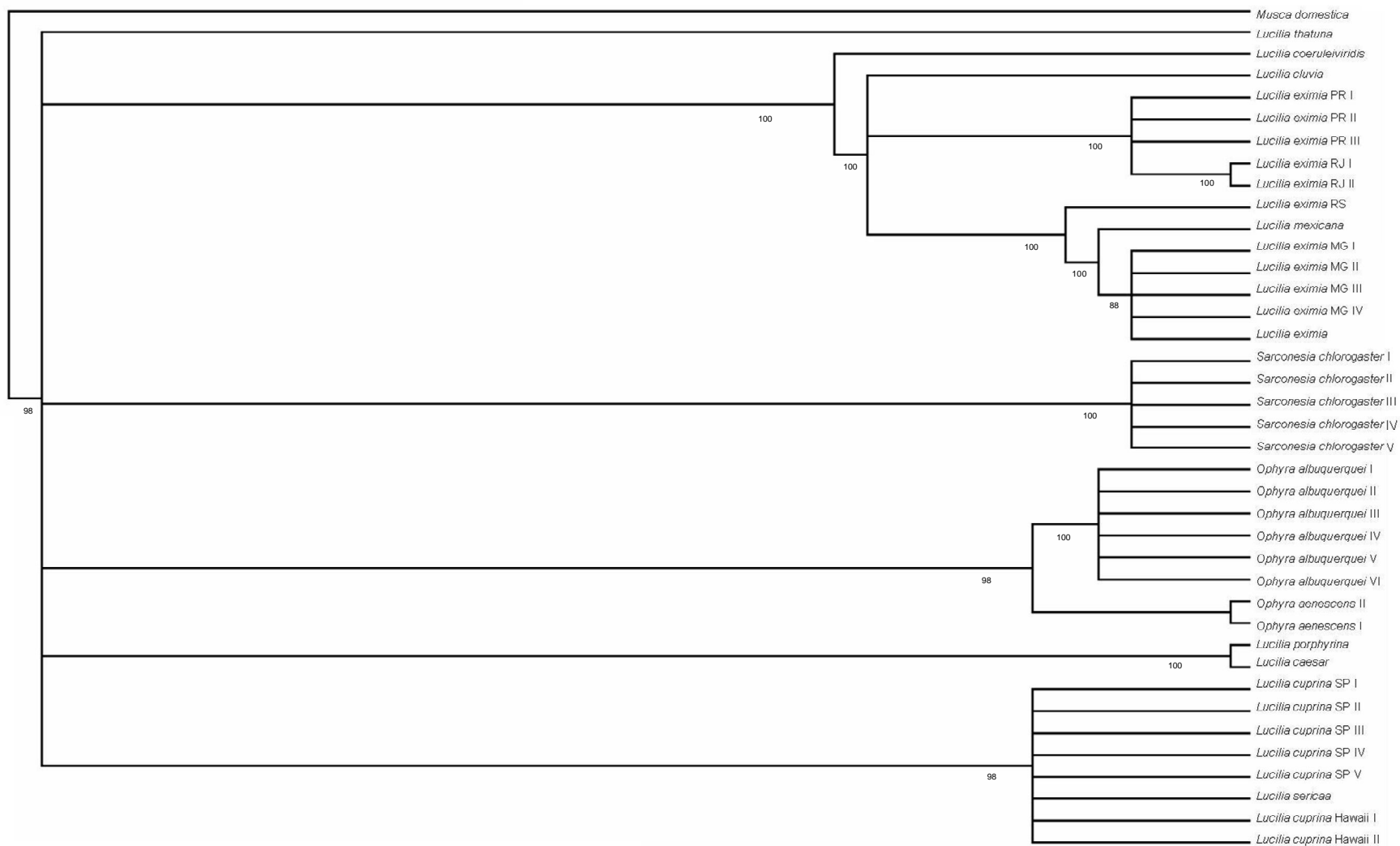


Figura 2. Cladograma obtido a partir de Inferência Bayesiana. Os valores abaixo dos ramos correspondem aos valores de probabilidade posterior. As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

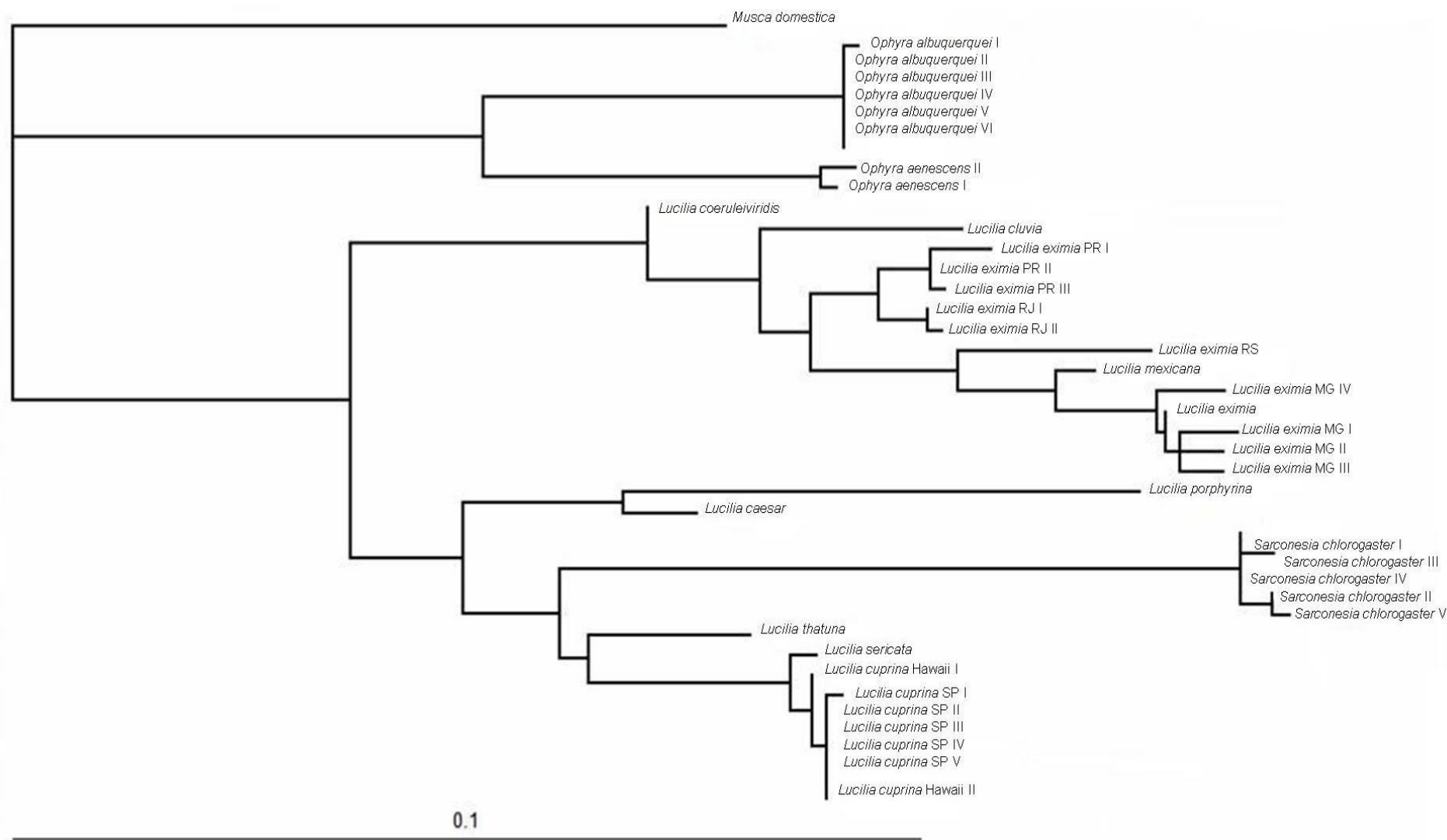


Figura 3. Cladograma obtido a partir de Máxima Verossimilhança, $-\ln L = 2493.62505$. As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

LISTA DE FIGURAS

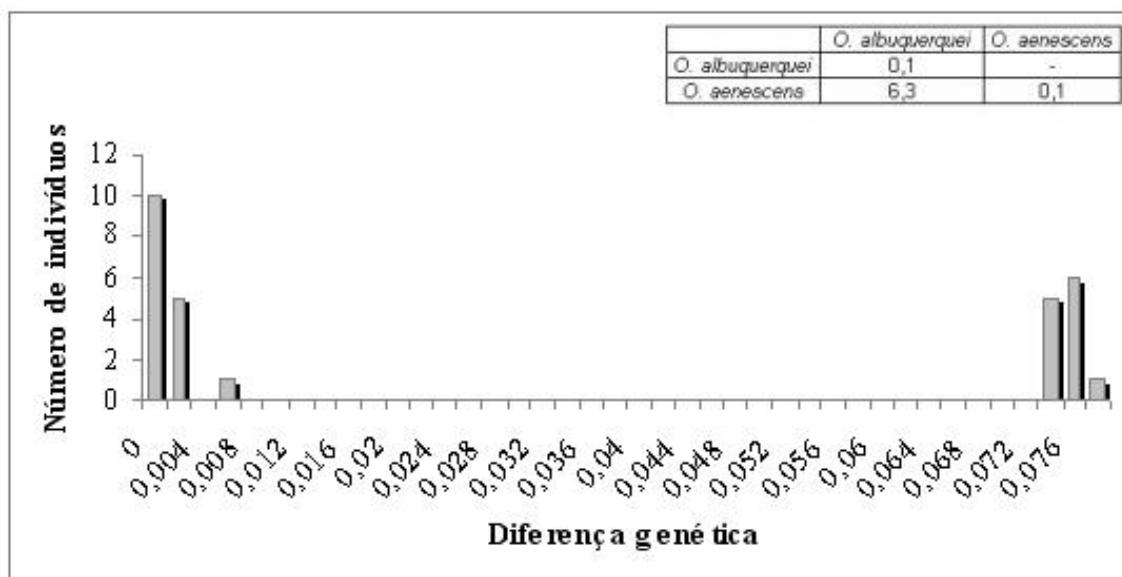


Figura 4. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *Ophyra albuquerquei* e *O. aenescens*.

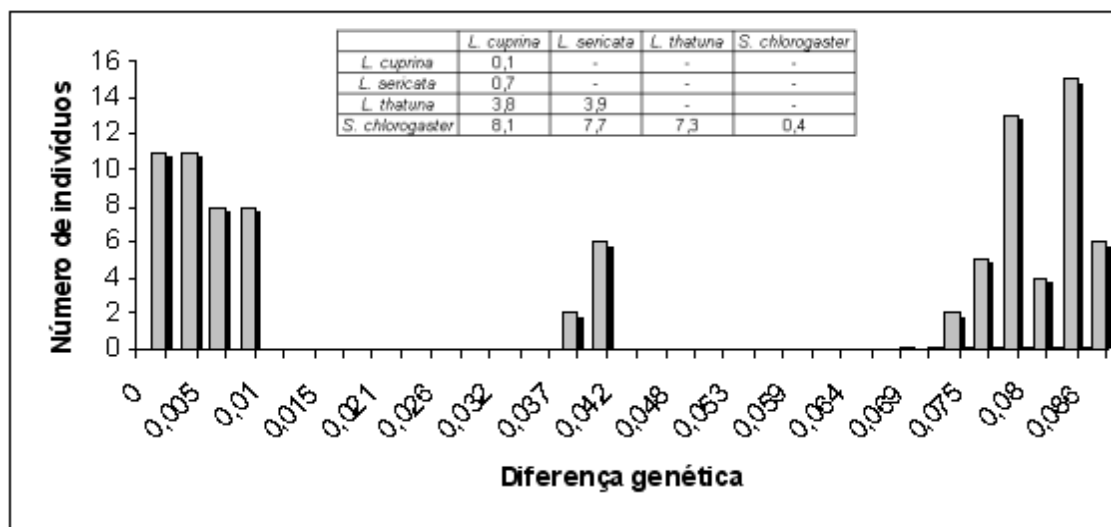


Figura 5. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *L. cuprina*, *L. sericata*, *L. thatuna* e *Sarconesia chlorogaster*.

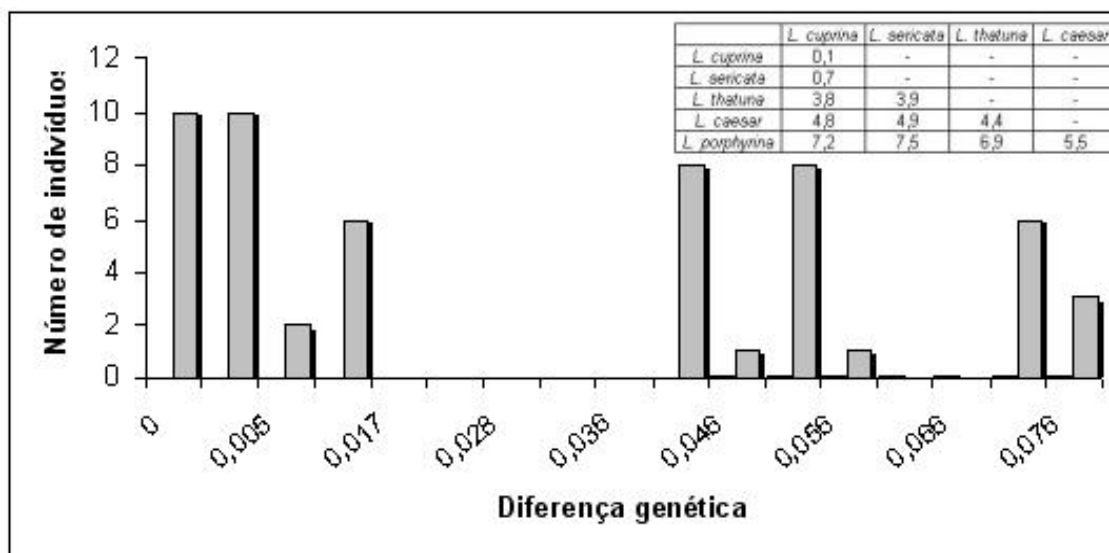


Figura 6. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *L. cuprina*, *L. sericata*, *L. thatuna*, *L. caesar* e *L. porphyria*.

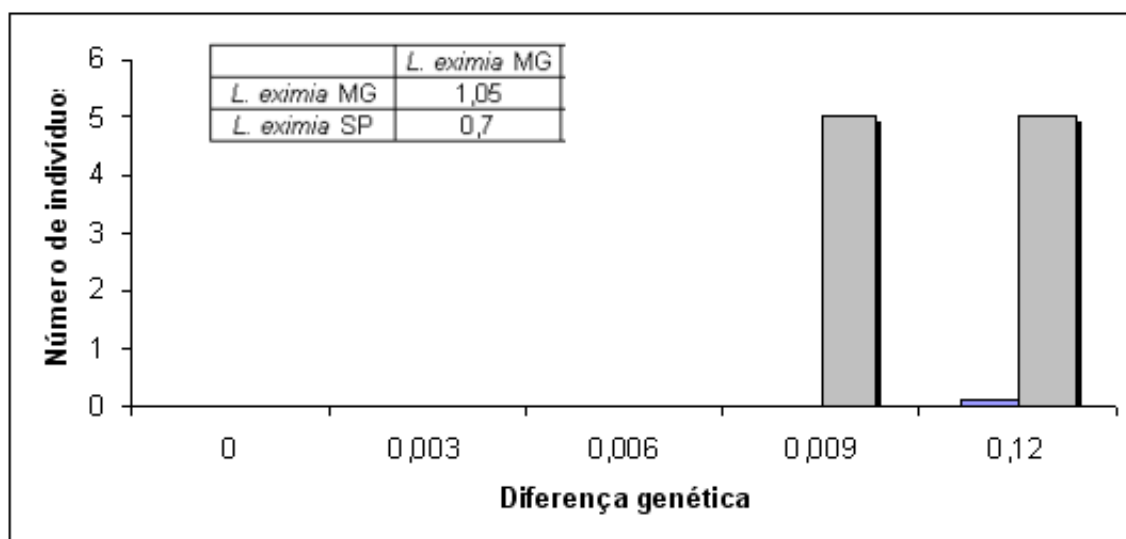


Figura 7. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *L. eximia* de Minas Gerais (MG) e *L. eximia* de São Paulo (SP).

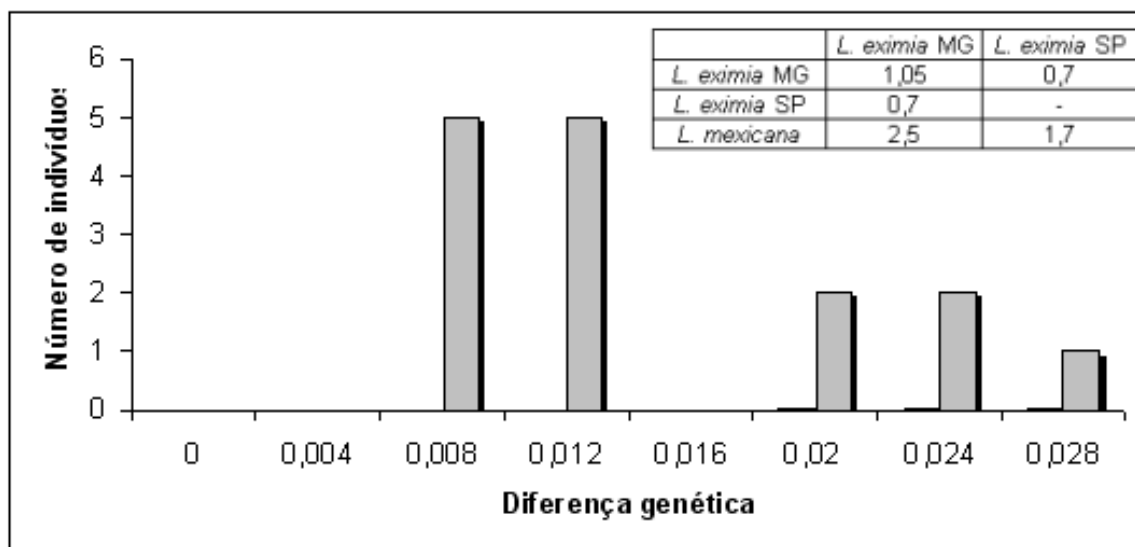


Figura 8. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *L. eximia* de Minas Gerais (MG), *L. eximia* de São Paulo (SP) e *L. mexicana*.

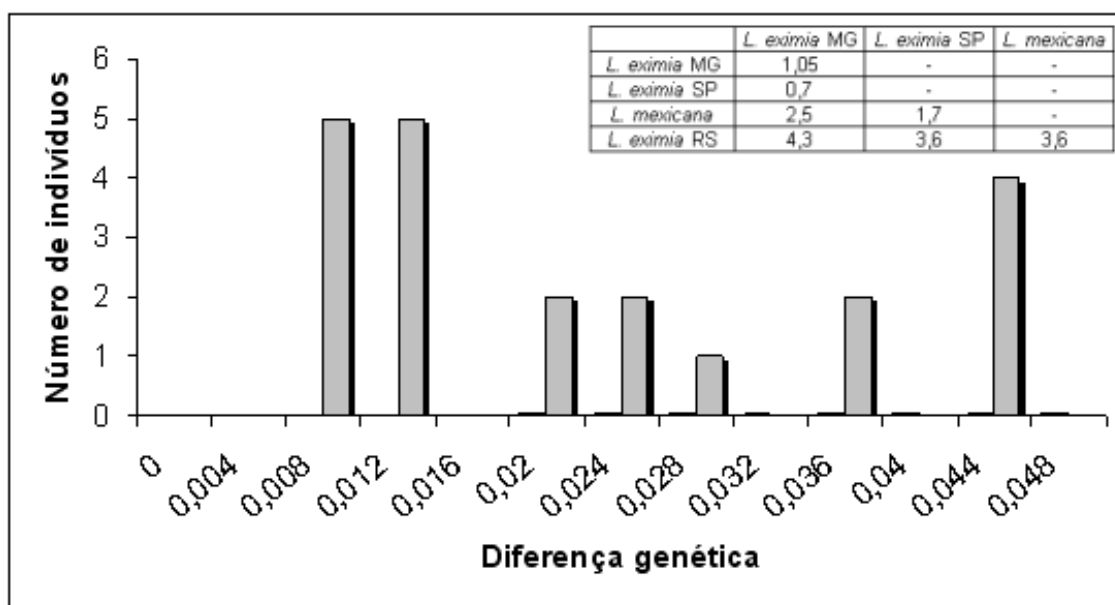


Figura 9. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *L. eximia* de Minas Gerais (MG), *L. eximia* de São Paulo (SP), *L. eximia* do Rio Grande do Sul (RS) e *L. mexicana*.

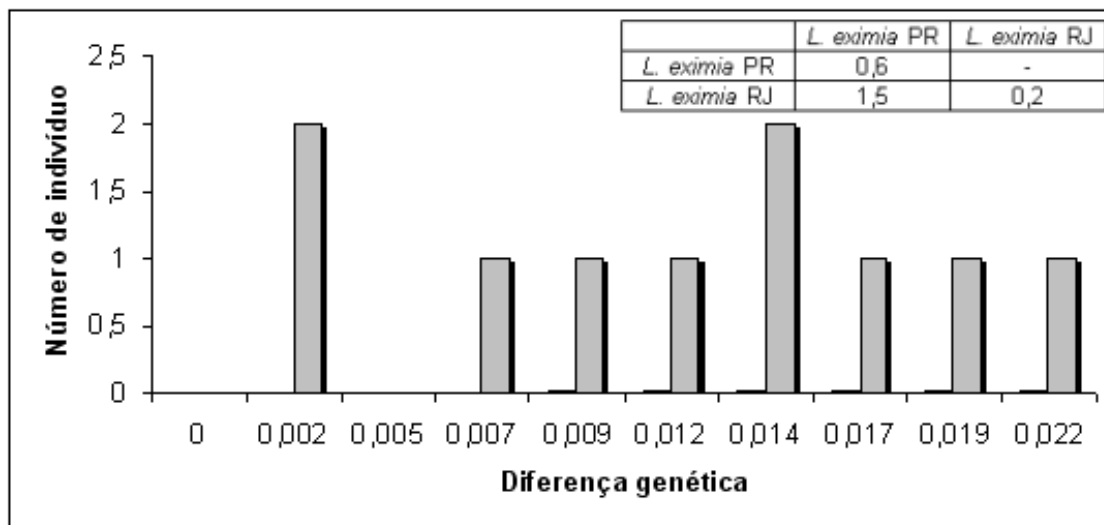


Figura 10. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *L. eximia* do Paraná (PR) e *L. eximia* do Rio de Janeiro (RJ).

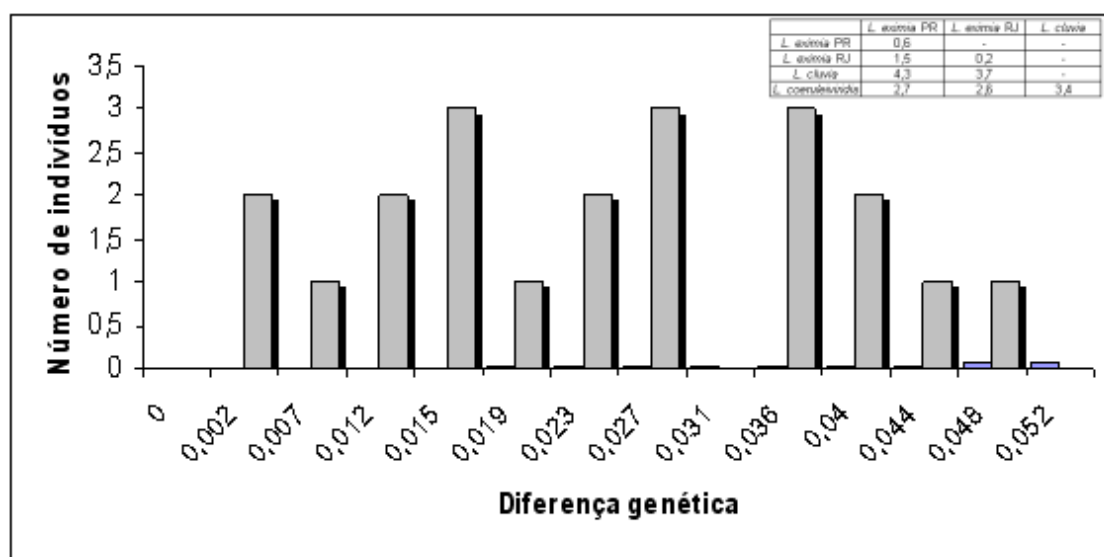


Figura 11. Histograma de frequência e percentagem das diferenças entre nucleotídeos dos exemplares de *L. eximia* do Paraná (PR), *L. eximia* do Rio de Janeiro (RJ), *L. cluvia* e *L. coeruleiviridis*.

ANEXO I. Sequências da citocromo c oxidase I (COI). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
L. cuprina SP I	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. cuprina SP II	GGAGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. cuprina SP III	GGAGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. cuprina SP IV	GGAGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. cuprina SP V	GGAGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. sericata	GGAGCT-----CGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia PR I	GAAGCATGATCTGGTATAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia PR II	GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia PR III	GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia RS	GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia RJ I	GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia RJ II	GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia MG I	CGGGCTTGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCCGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAACGT.								
L. eximia MG II	CCGGCCCCGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCCGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia MG III	CGGGCATGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCCGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia MG IV	GAGGCATGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCCGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
S. chlorogaster I	GGGGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
S. chlorogaster II	GGGGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
S. chlorogaster III	GGGGCTTGATCCGGAGAAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
S. chlorogaster IV	GGGGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
S. chlorogaster V	GGGGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. albuquerquei I	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCAGAATTAGGTTCATCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. albuquerquei II	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCAGAATTAGGTTCATCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. albuquerquei III	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCAGAATTAGGTTCATCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. albuquerquei IV	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCAGAATTAGGTTCATCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. albuquerquei V	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCAGAATTAGGTTCATCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. albuquerquei VI	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTTA	ATTCGAGCAGAATTAGGTTCATCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. aenescens II	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGGACTTCATTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGTTCACCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
O. aenescens I	GGAGCATGATCCGGAATAATTGGGACTTCATTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGTTCACCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. porphyrina	GGAGCTTGATCTGGTATGATCGGAACCTTCATTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGTGCACTAATTGGAGATGACCAAAATTTATAATGT.								
L. cuprina Hawaii I	GGAGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. mexicana	GGAGCTTGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCCGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. coeruleiviridis	GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. eximia Brasil	GGGGCTTGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCCGAATTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAAATTTATAATGT.								
L. cuprina Hawaii II	GGAGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAAATTC	TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. cluvia	GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACCTTCCTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAAATTTATAATGT.								
L. thatuna	GGAGCATGATCTGGTATAATCGGAACCTTCCTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGTGCACTAATTGGAGATGACCAAAATTTATAATGT.								
L. caesar	GGAGCTTGATCCGGTATAATCGGAACCTTCATTAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGTGCACTAATTGGAGATGACCAAAATTTATAATGT.								
M. domestica	GGAGCATGATCTGGTATAGTAGGAACATCATTAAAGAAATTTA	ATTCGAGCTGAATTAGGACACCCCTGGTGCTCTAATTGGAGACGATCAAAATTTATAATGT.								

ANEXO I. Sequências da citocromo c oxidase I (COI). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
L. cuprina SP I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATCTAGGAGCT									
L. cuprina SP II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATCTAGGAGCT									
L. cuprina SP III	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATCTAGGAGCT									
L. cuprina SP IV	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATCTAGGAGCT									
L. cuprina SP V	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATCTAGGAGCT									
L. sericata	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATCTAGGAGCT									
L. eximia PR I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGGTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia PR II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGGTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia PR III	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGGTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia RS	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. eximia RJ I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGGTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia RJ II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGGTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia MG I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia MG II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia MG III	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
L. eximia MG IV	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCC									
S. chlorogaster I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
S. chlorogaster II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
S. chlorogaster III	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
S. chlorogaster IV	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
S. chlorogaster V	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. albuquerquei I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. albuquerquei II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. albuquerquei III	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. albuquerquei IV	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. albuquerquei V	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. albuquerquei VI	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. aenescens II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
O. aenescens I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. porphyrina	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. cuprina Hawaii I	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. mexicana	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. coeruleiviridis	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. eximia Brasil	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. cuprina Hawaii II	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. cluvia	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGGTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. thatuna	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
L. caesar	AATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATTATAAATGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									
M. domestica	TATTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAAATGGAGGGTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTAATATTAGGAGCT									

ANEXO I. Sequências da citocromo c oxidase I (COI). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
L. cuprina SP I	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. cuprina SP II	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. cuprina SP III	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. cuprina SP IV	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. cuprina SP V	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. sericata	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia PR I	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia PR II	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia PR III	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia RS	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia RJ I	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia RJ II	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia MG I	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia MG II	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia MG III	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia MG IV	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
S. chlorogaster I	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGGGCTG							
S. chlorogaster II	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGGGCTG							
S. chlorogaster III	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGGGCTG							
S. chlorogaster IV	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGGGCTG							
S. chlorogaster V	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGGGCTG							
O. albuquerquei I	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGAGCCG							
O. albuquerquei II	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGAGCCG							
O. albuquerquei III	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGAGCCG							
O. albuquerquei IV	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGAGCCG							
O. albuquerquei V	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGAGCCG							
O. albuquerquei VI	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGAGCCG							
O. aenescens II	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGGGCTG							
O. aenescens I	CCTGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAACAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCAGCATTAAACCTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	TGGGGCTG							
L. porphyrina	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. cuprina Hawaii I	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. mexicana	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. coeruleiviridis	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. eximia Brasil	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. cuprina Hawaii II	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. cluvia	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. thatura	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
L. caesar	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAC	TTTTTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	CGGAGCTG							
M. domestica	CCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAT	TATTACCTCCTGCATTAACTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAA	GGGAGCTG							

ANEXO I. Sequências da citocromo c oxidase I (COI). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
L. cuprina SP I	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. cuprina SP II	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. cuprina SP III	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. cuprina SP IV	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. cuprina SP V	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. sericata	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCTCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. eximia PR I	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia PR II	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia PR III	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia RS	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia RJ I	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia RJ II	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia MG I	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia MG II	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia MG III	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia MG IV	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCCTCCCTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTGCAATTTAGCCGGGATTTTC						
S. chlorogaster I	GAA	CAGGATGAA	CTGTTTATCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
S. chlorogaster II	GAA	CAGGATGAA	CTGTTTATCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
S. chlorogaster III	GAA	CAGGATGAA	CTGTTTATCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
S. chlorogaster IV	GAA	CAGGATGAA	CTGTTTATCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
S. chlorogaster V	GAA	CAGGATGAA	CTGTTTATCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
O. albuquerquei I	GAA	CAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATCTC						
O. albuquerquei II	GAA	CAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATCTC						
O. albuquerquei III	GAA	CAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATCTC						
O. albuquerquei IV	GAA	CAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATCTC						
O. albuquerquei V	GAA	CAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATCTC						
O. albuquerquei VI	GAA	CAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATCTC						
O. aenescens II	GTACAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATTTTCTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTC							
O. aenescens I	GTACAGGTTGAA	CTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATTTTCTCTTTACATTTAGCAGGAATTTTC							
L. porphyra	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. cuprina Hawaii I	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. mexicana	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
L. coeruleiviridis	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCCGGGATTTTC						
L. eximia Brasil	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCCTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
L. cuprina Hawaii II	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
L. cluvia	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTCCTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
L. thatuna	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTCCTTACATTTAGCTGGAATTTTC						
L. caesar	GAA	CAGGATGAA	CAGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCAT	GGAGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTCCTTTCATTTAGCAGGAATTTTC						
M. domestica	GAA	CAGGTTGAA	CTGTTTATCCACCTTTATCATCAATTATTGCTCAT	GGTGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTTC						

ANEXO I. Sequências da citocromo c oxidase I (COI). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
L. cuprina SP I	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. cuprina SP II	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. cuprina SP III	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. cuprina SP IV	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. cuprina SP V	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. sericata	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. eximia PR I	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCCGTAGTA				
L. eximia PR II	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCCGTAGTA				
L. eximia PR III	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCCGTAGTA				
L. eximia RS	CTTCAATTTTAGGGGCGGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATGCGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
L. eximia RJ I	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCCGTAGTA				
L. eximia RJ II	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCCGTAGTA				
L. eximia MG I	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
L. eximia MG II	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
L. eximia MG III	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
L. eximia MG IV	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
S. chlorogaster I	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTCAACTGTA	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATGATCTGTTGTA				
S. chlorogaster II	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTCAACTGTA	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATGATCTGTTGTA				
S. chlorogaster III	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTCAACTGTA	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATGATCTGTTGTA				
S. chlorogaster IV	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTCAACTGTA	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATGATCTGTTGTA				
S. chlorogaster V	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTCAACTGTA	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATGATCTGTTGTA				
O. albuquerquei I	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTATTAACAGT	ATTAATATACGATCAAC	CTGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGATCAGTAGTT				
O. albuquerquei II	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTATTAACAGT	ATTAATATACGATCAAC	CTGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGATCAGTAGTT				
O. albuquerquei III	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTATTAACAGT	ATTAATATACGATCAAC	CTGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGATCAGTAGTT				
O. albuquerquei IV	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTATTAACAGT	ATTAATATACGATCAAC	CTGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGATCAGTAGTT				
O. albuquerquei V	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTATTAACAGT	ATTAATATACGATCAAC	CTGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGATCAGTAGTT				
O. albuquerquei VI	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTATTAACAGT	ATTAATATACGATCAAC	CTGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGATCAGTAGTT				
O. aenescens II	CTTCTATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACTGTA	ATTAATATAAGATCTACT	GGAATTACATTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTT				
O. aenescens I	CTTCTATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACTGTA	ATTAATATAAGATCTACT	GGAATTACATTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTT				
L. porphyrina	CATCAATTTAGGAGCCGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. cuprina Hawaii I	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. mexicana	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
L. coeruleiviridis	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCCGTAGTA				
L. eximia Brasil	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
L. cuprina Hawaii II	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. cluvia	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCTGTAGTA				
L. thatuna	CTTCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
L. caesar	CATCAATTTTAGGAGCTGTA	AAATTTTATTACTACAGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTAGTA				
M. domestica	CTTCAATTTTAGGAGCAGT	AAATTTTATTCAACTGTT	ATTAATATACGATCAAC	CAGGAATTACTTTTGAT	CGAATACCTTTATTTGTT	GATCAGTTGTA				

ANEXO I. Sequências da citocromo c oxidase I (COI). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
L. cuprina SP I	ATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGATCCTG									
L. cuprina SP II	ATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGATCCTG									
L. cuprina SP III	ATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGATCCTG									
L. cuprina SP IV	ATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGATCCTG									
L. cuprina SP V	ATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGATCCTG									
L. sericata	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGACCCCTG									
L. eximia PR I	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCG									
L. eximia PR II	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCG									
L. eximia PR III	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCG									
L. eximia RS	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGGGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCTG									
L. eximia RJ I	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCTG									
L. eximia RJ II	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCTG									
L. eximia MG I	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGGGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATCTTAACACCTTCATTCTTTGACCCCG									
L. eximia MG II	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGGGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATCTTAACACCTTCATTCTTTGACCCCG									
L. eximia MG III	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGGGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATCTTAACACCTTCATTCTTTGACCCCG									
L. eximia MG IV	ATTACAGCTTTATTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCCGGGGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATCTTAACACCTTCATTCTTTGACCCCG									
S. chlorogaster I	ATTACAGCTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
S. chlorogaster II	ATTACAGCTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
S. chlorogaster III	ATTACAGCTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
S. chlorogaster IV	ATTACAGCTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
S. chlorogaster V	ATTACAGCTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
O. albuquerquei I	ATTACAGCTCTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
O. albuquerquei II	ATTACAGCTCTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
O. albuquerquei III	ATTACAGCTCTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
O. albuquerquei IV	ATTACAGCTCTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
O. albuquerquei V	ATTACAGCTCTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
O. albuquerquei VI	ATTACAGCTCTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGATCCTG									
O. aenescens II	ATTACTGCTCTTTTATTATTATTATCTCTCCAGTTTATAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGACCCAG									
O. aenescens I	ATTACTGCTCTTTTATTATTATTATCTCTCCAGTTTATAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGACCCAG									
L. porphyrina	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCACTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGATCCAG									
L. cuprina Hawaii I	ATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGACCCCTG									
L. mexicana	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCTTTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCTG									
L. coeruleiviridis	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAATCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCTG									
L. eximia Brasil	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCTTTACCAGTATTAGCCGGGGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATCTTAACACCTTCATTCTTTGACCCCG									
L. cuprina Hawaii II	ATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGATCCTG									
L. cluvia	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATCTTAATACTTCATTCTTTGACCCCTG									
L. thatuna	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAAACAGATCGAAATCTTAATACCTTCATTCTTTGACCCCTG									
L. caesar	ATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAATCTTAATACCTTCATTCTTTGATCCAG									
M. domestica	ATTACTGCATTATTATTATTATCTCTTCTGTTCTTGCTGGAGCTATTACTATACTATTAACTGATCGAAATTTAAATACCTTCATTCTTTGACCCAG									

ANEXO I. Sequências da citocromo c oxidase I (COI). As abreviações referem-se aos estados brasileiros nos quais cada espécime foi coletado: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; MG, Minas Gerais. Cada numeral romano corresponde a um indivíduo.

	610
L. cuprina SP I	CAGGAGGAGGA
L. cuprina SP II	CAGGAGGAGGA
L. cuprina SP III	CAGGAGGAGGA
L. cuprina SP IV	CAGGAGGAGGA
L. cuprina SP V	CAGGAGGAGGA
L. sericata	CAGGAGGAGGA
L. eximia PR I	CCGGAGGGGGA
L. eximia PR II	CCGGAGGGGGA
L. eximia PR III	CCGGAGGGGGA
L. eximia RS	CTGGAGGAGGA
L. eximia RJ I	CCGGAGGGGGA
L. eximia RJ II	CCGGAGGGGGA
L. eximia MG I	CTGGAGGTGAT
L. eximia MG II	CTGGAGGAGGA
L. eximia MG III	CTGGAGGAGGA
L. eximia MG IV	CTGGAGGAGAC
S. chlorogaster I	CTGGAGGAGGA
S. chlorogaster II	CTGGAGGAGGA
S. chlorogaster III	CTGGAGGAGGA
S. chlorogaster IV	CTGGAGGAGGA
S. chlorogaster V	CTGGAGGAGGA
O. albuquerquei I	CCGGAGGAGGA
O. albuquerquei II	CCGGAGGAGGA
O. albuquerquei III	CCGGAGGAGGA
O. albuquerquei IV	CCGGAGGAGGA
O. albuquerquei V	CCGGAGGAGGA
O. albuquerquei VI	CCGGAGGAGGA
O. aenescens II	CAGGTGGAGGA
O. aenescens I	CAGGTGGAGGA
L. porphyrina	CAGGAGGAGGA
L. cuprina Hawaii I	CAGGAGGAGGA
L. mexicana	CCGGAGGAGGA
L. coeruleiviridis	CCGGAGGAGGA
L. eximia Brasil	CTGGAGGAGGA
L. cuprina Hawaii II	CAGGAGGAGGA
L. cluvia	CCGGAGGAGGA
L. thatuna	CGGGAGGAGGA
L. caesar	CAGGAGGAGGA
M. domestica	CTGGAGGAGGT

